

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 1 月 29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/009521 A1

(51) 国際特許分類: C07C 35/44, A61K 31/704,  
31/56, A61P 9/00, 25/00, 27/02, 35/00, 43/00, A23L 1/30,  
C07H 15/256, C07J 63/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009060

(22) 国際出願日: 2003 年 7 月 17 日 (17.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-209320 2002 年 7 月 18 日 (18.07.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカ  
ラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒  
520-2193 滋賀県 大津市 瀬田三丁目 4 番 1 号 Shiga  
(JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大野木 宏  
(OHNOGI, Hiromu) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草津  
市 西渋川二丁目 1 2-1-3 1 1 Shiga (JP). 杉山 勝  
美 (SUGIYAMA, Katsumi) [JP/JP]; 〒520-2134 滋賀県  
大津市 瀬田三丁目 8-8-2 1 0 Shiga (JP). 佐川 裕  
章 (SAGAWA, Hiroaki) [JP/JP]; 〒525-0025 滋賀県 草  
津市 西渋川二丁目 6-3 2 Shiga (JP). 加藤 郁之進

(KATO, Ikunoshin) [JP/JP]; 〒611-0028 京都府 宇治市  
南陵町 1-1-1 5 0 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 細田 芳徳 (HOSODA, Yoshinori); 〒540-6591  
大阪府 大阪市 中央区大手前一丁目 7 番 3 1 号 OMM  
ビル 5 階 私書箱 2 6 号 細田国際特許事務所内 Osaka  
(JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,  
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,  
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,  
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO,  
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,  
SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,  
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,  
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許  
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,  
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),  
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,  
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY

(54) 発明の名称: 治療剤

(57) Abstract: A remedy or a preventive for diseases with a need for the enhanced production of nerve growth factor (NGF) for the treatment or prevention thereof, an NGF production enhancer and a food, a drink or a feed for enhancing NGF production each containing as the active ingredient a compound selected from the group consisting of soyasaponin compounds, soyasapogenin compounds, glycyrrhizin and salts thereof; and novel soyasaponin compounds and soyasapogenin compounds having an effect of enhancing NGF production.

(57) 要約: 本発明は、ソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物、グリチルリチン及びそれらの塩からなる群より選択される化合物を有効成分とする、治療又は予防に神経成長因子(NGF)産生増強を要する疾患の治療剤または予防剤、NGF産生増強剤、並びにNGF産生増強用食品、飲料又は飼料に関する。また、本発明は、NGF産生増強作用を有する新規なソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物に関する。

WO 2004/009521 A1

## 明 細 書

### 治療剤

#### 技術分野

本発明は、主として食用植物由来の化合物の生理作用を利用した医薬、飲食品等に関する。

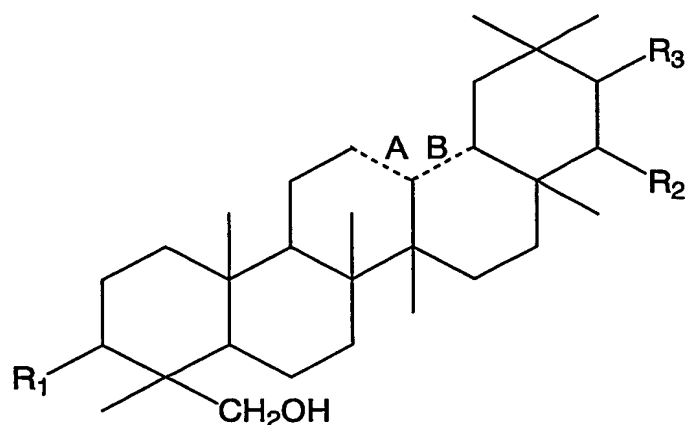
#### 背景技術

神経成長因子（NGF）は神経細胞の誕生を促す作用、神経細胞の生存を維持する作用、脳の損傷時に修復する作用、脳神経の機能を回復し脳の老化を防止する作用など神経細胞の生と死に密接に関わるタンパク質である。従ってアルツハイマー型痴呆症や糖尿病合併症の神経障害等の予防・治療効果が期待されている。しかしながらNGFは分子量が大きく血液脳関門を通過できないため、血液脳関門を通過できるNGF産生増強物質の開発が望まれている。

#### 発明の開示

本発明の目的は上記現状に鑑み、天然物由来の安全なNGF産生増強物質を利用した治療又は予防にNGF産生増強を要する疾患用医薬、当該化合物を高含有する飲食品等を提供することにある。

本発明を概説すれば、本発明の第1、第2、第3及び第4の発明は、下記一般式（I）で表される新規な化合物又はその塩、当該化合物を有効成分として含有する当該化合物に感受性を示す疾患の治療剤または予防剤、神経成長因子産生増強剤、神経成長因子産生増強用食品、飲料又は飼料に関する。

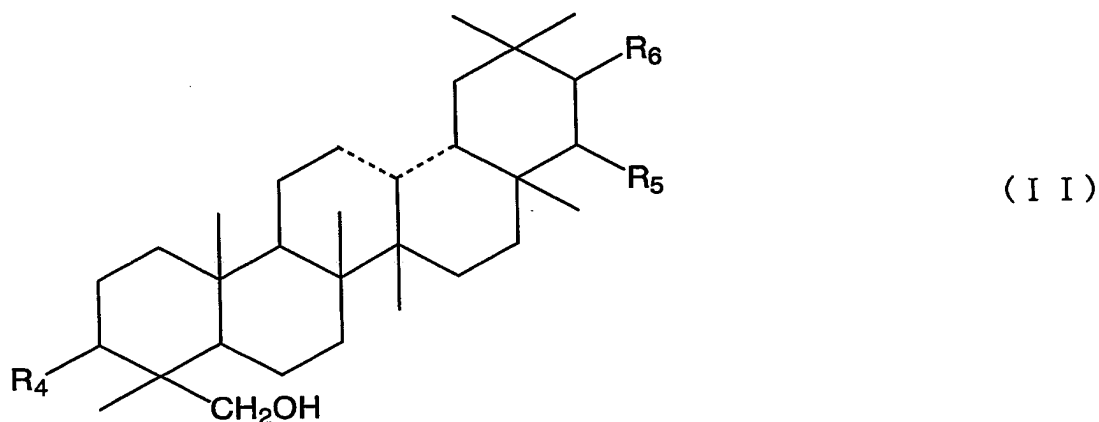


(I)

(式中、点線で示した結合子のうちAが二重結合を示し、Bが単結合を示す場合、R<sub>1</sub> は-O-GlcUA-Gal-Glcを示し、R<sub>2</sub> は-O-Ara-2-AcXyl、-O-Ara-3-AcXyl、-O-Ara-4-AcXyl、-O-Ara-2,3-diAcXyl、-O-Ara-2,4-diAcXyl、-O-Ara-3,4-diAcXyl、または-O-Ara-3,4,6-triAcGlcを示し、かつR<sub>3</sub> は-OHを示す。またAが単結合を示し、Bが二重結合を示す場合、R<sub>1</sub> は-OHを示し、R<sub>2</sub> は-OHを示し、かつR<sub>3</sub> は-Hを示す。なお、GlcUAはグルクロン酸残基、Galはガラクトース残基、Glcはグルコース残基、Araはアラビノース残基、AcXylはアセチル化されたキシロース残基、AcGlcはアセチル化されたグルコース残基を意味する。)

また、本発明の第5、第6および第7の発明は、ソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物、グリチルリチン (glycyrrhizin) 及び薬理学的に許容されるそれらの塩からなる群より選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする治療又は予防に神経成長因子産生増強を要する疾患の治療剤または予防剤、神経成長因子産生増強剤、および神経成長因子産生増強用食品、飲料又は飼料に関する。

本発明の第5、第6および第7の発明の態様において、ソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物としては下記一般式（I I）で表わされる化合物が例示される。



（式中、点線で示した結合子は単結合もしくは二重結合を示し、 $R_4$  は $-OH$ もしくは $-O-$ 糖残基を示し、 $R_5$  は $-OH$ 、 $=O$ もしくは $-O-$ 糖残基を示し、 $R_6$  は $-OH$ もしくは $-H$ を示す。）

#### 図面の簡単な説明

第1図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション7の質量スペクトルを示す図である。

第2図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション7の $^1H$ -NMRスペクトルを示す図である。

第3図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション7の $^{13}C$ -NMRスペクトルを示す図である。

第4図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション9の質量スペクトルを示す図である。

第5図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション9の $^1H$ -NMRスペクトルを示す図である。

第6図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション9の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第7図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション10の質量スペクトルを示す図である。

第8図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション10の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第9図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション10の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第10図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション12の質量スペクトルを示す図である。

第11図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション12の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第12図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション12の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第13図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション13の質量スペクトルを示す図である。

第14図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション13の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第15図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション13の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第16図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション15の質量スペクトルを示す図である。

第17図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション15の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第18図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション15の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す図である。

第 19 図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 16 の質量スペクトルを示す図である。

第 20 図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 16 の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示す図である。

第 21 図は、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 16 の<sup>13</sup>C-NMR スペクトルを示す図である。

第 22 図は、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクション a の質量スペクトルを示す図である。

第 23 図は、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクション a の<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示す図である。

第 24 図は、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクション a の<sup>13</sup>C-NMR スペクトルを示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

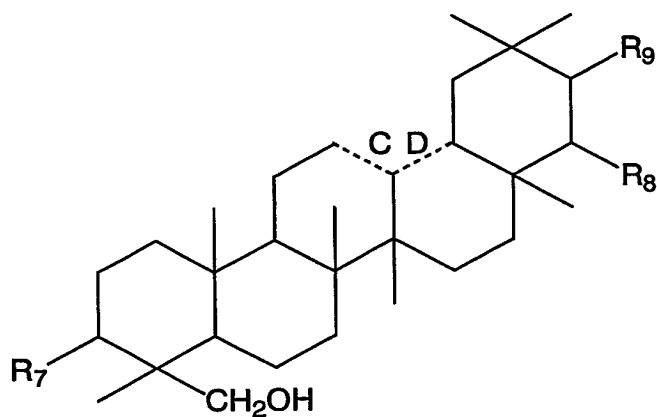
本発明者らは食用植物由来の NGF 産生増強物質として、特定のサポニン類化合物、サポゲニン類化合物及び／又はそれらの塩が有用であることを見出し、本発明を完成させた。本発明により、それらのサポニン類化合物、サポゲニン類化合物及び／又は薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分として含んでなる医薬、当該サポニン類化合物、サポゲニン類化合物及び／又はそれらの塩を高含有する飲食品、飼料等の提供が可能になった。

本明細書において、「NGF 産生増強作用」及び「NGF 産生増強活性」はそれぞれ NGF 産生増強をもたらすことおよび NGF 産生を増強する機能をいうが、その意味において特に厳密に区別するものではない。「増強」には、本発明に係る有効成分の作用前に比し、作用後において目的物質の量が増加するという態様と共に、本発明に係る有効成分を作用させることにより目的物質を生起せしめるという態様（誘導）を含む。また本明細書において、有効成分として挙げるい

ずれの物質も単独もしくは2種以上混合して本発明において用いることができる。

本発明において有効成分として使用される、サポニン類化合物、サポゲニン類化合物及び／又はそれらの塩（以下、本発明の化合物と称することがある）は、NGF産生増強作用を有していればよく、天然物由来でもよく、合成品、半合成品でもよい。天然物としては食用植物由来が好ましく、食用植物由来としては大豆等の豆類由来のソヤサポニン類化合物又はソヤサポゲニン類化合物が例示される。また、甘草由来のサポニンとして知られるグリチルリチンが例示される。

大豆には化学構造上A、B、E及びDDMPサポニンの4グループのサポニンが含まれており、Aグループサポニンは、olean-12-en-3 $\beta$ , 21 $\beta$ , 22 $\beta$ , 24-tetraol (soyasapogenol A) をアグリコンとするサポニンであり、Bグループサポニンは、olean-12-en-3 $\beta$ , 22 $\beta$ , 24triol (soyasapogenol B) をアグリコンとするサポニンであり、さらにEグループサポニンはolean-12-en-3 $\beta$ , 24-diol-2-one (soyasapogenol E) をアグリコンとするサポニンであり、DDMPサポニンはBグループサポニンをアグリコンとし、C-22位に2,3-dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-oneが結合したサポニンである（食品と開発、Vol 34, No. 7 第8～11頁, (1999)）。すなわち、本発明において、ソヤサポニン類化合物としてはA、B、Eグループ及びDDMPサポニンが特に好適に使用される。また、本発明の化合物としては、上記一般式（II）で表される化合物が例示され、特に好適には下記一般式（III）で表される化合物a～nが例示される。



(式中、点線で示した結合子C、D、および $R_7$ 、 $R_8$ 、 $R_9$ を表1に示す。)

表1

	C	D	$R_7$	$R_8$	$R_9$
化合物 a	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-2-AcXyl	-OH
化合物 b	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-3-AcXyl	-OH
化合物 c	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-4-AcXyl	-OH
化合物 d	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-2, 3-diAcXyl	-OH
化合物 e	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-2, 4-diAcXyl	-OH
化合物 f	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-3, 4-diAcXyl	-OH
化合物 g	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-3, 4, 6-triAcGlc	-OH
化合物 h	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-2, 3, 4, 6-tetraAcGlc	-OH
化合物 i	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-OH	-H
化合物 j	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Rham	-OH	-H
化合物 k	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	=0	-H
化合物 l	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Rham	=0	-H
化合物 m	二重結合	単結合	-O-GlcUA-Gal-Glc	-O-Ara-2, 3, 4-triAcXyl	-H
化合物 n	単結合	二重結合	-OH	-OH	-H



なお、上記化合物 a～g および n、すなわち上記一般式 (I) で表される化合物は、本発明により初めて得られた化合物であり、NGF 産生増強作用を有することが明らかになった。本発明においては、当該化合物、および当該化合物を有効成分とする、当該化合物に感受性を示す疾患の治療剤又は予防剤をも提供される。

また、本発明の化合物としては、大豆や甘草由来のものが好ましいが、大豆由来でなくともソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物またはグリチルリチン、例えば、上記一般式 (I I) で表される化合物であれば、その由来は限定されない。なお、本明細書中において、AcXyl は、アセチル化されたキシロース残基を意味する。AcGlc は、アセチル化されたグルコース残基を意味する。Rham は、ラムノース残基を意味する。また、ソヤサポゲニン類化合物とはソヤサポニン類化合物において糖残基を有しないアグリコンもしくはその異性体を意味する。

糖残基を構成する糖としては、単糖でも糖鎖でもよく、また、1 種又は 2 種以上の糖からなるものであってもよい。例えば、グルコース、グルクロン酸、キシロース、ラムノース、ガラクトース、スレオース、リボース、アピオース、アロース、アラビノース、アラビノピラノース、リブロース、マンノース、タロース、フコース、フルクトース、ガラクツロン酸およびこれらの糖により構成される糖鎖が例示される。糖鎖中の糖の数としては、特に限定はないが、本発明の所望の効果の発現の観点から、2～5 が特に好適である。またこれらの糖はアセチル化、エステル化等の修飾がされていても良い。

さらに、本発明の化合物は、例えばエステルなど、体内で容易に加水分解し、所望の効果を発揮し得る誘導体（プロドラッグ）を形成可能である。かかるプロドラッグの調製は公知の方法に従えばよい。なお、かかる誘導体は、それらの塩であってもよい。

また、本発明の化合物において、塩としては薬理学的に許容される塩が好ましい。本発明で使用される塩としては、例えば、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩、有機塩基との塩などが例示される。なお、本発明において使用される薬理学的に許容される塩とは生物に対して実質的に無毒であって、かつNGF産生増強作用を有する化合物の塩を意味する。本発明の有効成分である化合物の塩としては、たとえば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、アンモニウムまたはプロトン化されたベンザチン（N，N′-ジベンジルエチレンジアミン）、コリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、メグラミン（N-メチルグルカミン）、ペネタミン（N-ベンジルフェネチルアミン）、ピペラジンもしくはトロメタミン（2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1，3-プロパンジオール）との塩が挙げられる。

また、本発明の化合物の光学異性体、ケト-エノール互変異性体、幾何異性体などの各種異性体、各異性体の単離されたものであっても、NGF産生増強作用を有する限り、全て本発明において使用することができる。従って、本発明の化合物とは、本発明の所望の効果が得られ得る限り、その誘導体、異性体ならびにそれらの塩も包含するものである。

本発明の化合物が市販されておれば、それを利用することができる。また、調製することもでき、当該方法としては、例えば、植物から常法にしたがって抽出し、精製することにより得る方法を挙げることができる。

天然物からの本発明の化合物の製造は、公知の製造方法を組み合わせて行うことができる。例えば、ソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物又はそれらの塩の含有物、例えば、大豆等の植物から当該化合物を抽出し、精製することができる。また、大豆を使用する場合、好適には、大豆の胚芽、子葉を原料として使用する。抽出溶媒としては例えば、水、クロロホルム、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール等のアルコール類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、酢酸メチル、酢酸エチル等の親水性もしくは親油性の溶媒を、

単独でもしくは混合液として用いることができる。抽出温度や時間は所望により適宜設定すればよく、抽出操作は所望により数回繰り返してもよい。精製手段としては化学的方法、物理的方法等の公知の精製手段を用いればよく、ゲルろ過法、分子量分画膜による分画法、溶媒抽出法、イオン交換樹脂等を用いた各種クロマトグラフィー法等の従来公知の精製方法を組合せ、有効成分として使用される所望の化合物を濃縮、単離等すればよい。後述する本発明の医薬等は、単離した化合物を用いなくとも、化合物の濃縮物を用いて製造することもできる。

また、本発明に使用されるグリチルリチンとしては、特に限定はないが、例えば、市販のものや甘草から抽出、精製することにより得ることができる。グリチルリチンの抽出、精製は、前記ソヤサポニン類化合物等について記載した方法に準じて行うことができる。また、本発明においては、グリチルリチンの誘導体を使用することもできる。

本発明において有効成分として使用される化合物を合成品又は半合成品として得る場合には、例えば、公知の方法に準じて、所望の化合物を合成すればよい。

所望の化合物が得られたかの確認は、例えば、後述の実施例に記載するように、質量分析法、核磁気共鳴法等で構造を決定することにより行うことができる。

本発明により、以上の本発明の化合物を有効成分として含有してなる、治療又は予防にNGF産生増強を要する疾患の治療剤または予防剤が提供される。

NGFは神経細胞の生存や機能を維持したり、NGFの濃度勾配に従って神経細胞を伸長させたりする内因性の成長因子であり、NGFの産生を増強することにより、アルツハイマー病等の老人痴呆症や末梢神経障害、脳血管障害、脳腫瘍、脳尖、頭部外傷変性疾患、麻酔薬物中毒等による神経機能の修復・再生を要する疾患の治療または予防を行うことができる。また、筋萎縮性側索硬化症、薬剤障害性末梢神経障害、糖尿病性末梢神経障害、パーキンソン病、感覚神経障害、色素性網膜症、黄斑変性症等の治療または予防にも有用である。すなわち、本発明の医薬、後述する飲食品、飼料を投与、摂取することにより上記疾患の治療又

は予防が可能となる。

本発明の医薬としては、本発明において初めて得られた、一般式（I）で表される化合物及び／又は薬理学的に許容されるその塩を有効成分として含有することを特徴とする当該化合物に感受性を示す疾患の治療剤または予防剤が含まれる。

上記した本発明の治療剤又は予防剤は、本発明の化合物、例えば、ソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物、グリチルリチンまたは薬理学的に許容されるそれらの塩を有効成分とし、これを公知の医薬用担体と組合せ製剤化することにより製造できる。

本発明の医薬における有効成分の含有量は、治療等の対象となる疾患、使用態様等により異なり、一概には決定できないが、通常、0.01～50重量%、好適には0.1～10重量%程度である。

一般的には、本発明の化合物を薬理学的に許容できる液状または固体状の担体と配合し、かつ所望により溶剤、分散剤、乳化剤、緩衝剤、安定剤、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等を加えて、錠剤、顆粒剤、散剤、粉末剤、カプセル剤等の固形剤、通常液剤、懸濁剤、乳剤等の液剤とすることができる。また、これを使用前に適当な担体の添加によって液状となし得る乾燥品とすることができる。

本発明の治療剤又は予防剤は、経口剤や、注射剤、点滴用剤等の非経口剤のいずれの形態によっても投与することができる。

本発明の治療剤又は予防剤の投与量は、その製剤形態、投与方法、使用目的およびこれに適用される患者の年齢、体重、症状によって適宜設定され、一定ではないが、一般には製剤中に含有される有効成分の量で、通常、ヒトでは1日当り $1\mu\text{g}\sim 1\text{g}/\text{kg}$ 体重、好適には $10\mu\text{g}\sim 200\text{mg}/\text{kg}$ 体重程度である。もちろん、投与量は、種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、あるいは範囲を超えて必要な場合もある。また、投薬期間も特に限定されるものではない。本発明の医薬はそのまま経口投与するほ

か、任意の飲食品に添加して日常的に摂取させることもできる。

また、本発明は、本発明の化合物を有効成分として含有するNGF産生増強剤を提供する。当該増強剤としては、前記有効成分そのものであってもよく、また、前記有効成分を含む組成物であってもよい。本発明の態様においては、有効成分としての塩は薬理学的に許容される塩が好適である。NGF産生増強剤は、たとえば、前記有効成分を当該有効成分と同じ用途に使用可能な他の成分などと配合し、上記治療剤または予防剤の製造方法に準じて通常使用される試薬の形態に製造すればよい。かかる増強剤における前記有効成分の含有量は、当該増強剤の投与方法、使用目的などを考慮し、本発明の所望の効果の発現が得られ得るような量であればよく、特に限定されるものではない。NGF産生増強剤中の本発明の有効成分の含有量としては、通常、0.01～50重量%、好適には0.1～10重量%程度である。また、該増強剤の使用量も、本発明の所望の効果の発現が得られ得るようであれば特に限定されるものではない。特に、生体に投与して使用する場合には、好ましくは前記治療剤または予防剤における有効成分の投与量範囲内で有効成分を投与できるような量で使用すればよい。NGF産生増強剤は、NGF産生増強を必要とする疾患における当該成長因子の増強に有用である。また、当該増強剤はNGFに関連する疾患に対する薬物のスクリーニングにも有用である。さらに当該増強剤は、NGF又は神経細胞の物理的変化に関する機能研究にも有用である。

つぎに、前記有効成分を含有してなる、本発明の食品、飲料（以下、飲食品という場合がある）又は飼料について説明する。本発明の飲食品又は飼料において、含有とは、含有、添加及び希釈の意を含むものであり、本発明の飲食品又は飼料は、本発明の化合物を含有、添加および／または希釈してなる食品、飲料又は飼料である。該飲食品等は、そのNGF産生増強作用により、治療又は予防にNGF産生増強を要する疾患の症状改善、予防に極めて有用である。また、生体の恒常性維持にも有用である。有効成分として使用される化合物の塩としては、薬

理学的に許容される塩が好ましい。

なお、本発明の飲食品又は飼料にいう「含有」とは、飲食品等に本発明で利用される有効成分が含まれるという態様を、添加とは、飲食品等の原料に、本発明で利用される有効成分を添加するという態様を、希釈とは、本発明で利用される有効成分に、飲食品等の原料を添加するという態様をいう。

本発明の食品、飲料又は飼料の製造方法は、特に限定はないが、一般に用いられている食品、飲料又は飼料の製造方法を採用でき、製造された食品、飲料又は飼料に、本発明の化合物が有効成分として高含有されていればよく、通常の飲食品、飼料より高含有されておれば良い。すなわち、本発明の飲食品又は飼料は、通常、本発明の有効成分をその原料より濃縮又は単離し、それを、公知の飲食品又は飼料に配合することにより製造される。濃縮又は単離には、有効成分を合成することが含まれる。また、原料を、それに含まれる有効成分が高含有となるように処理可能であれば、該原料がヒトの食用に供されうるものである限り、得られる処理物をそのまま本発明の飲食品とすることも可能である。例えば、該処理物としては、濃縮果汁、野菜汁等が挙げられる。なお、ここで高含有とは、本発明の有効成分の原料、例えば大豆の単位重量あたりの本発明の化合物重量よりも、本発明の食品、飲料又は飼料の単位重量あたりの本発明の化合物重量の方が多いことを意味する。また、重量とは固形分重量をいう。

本発明の食品又は飲料は、特に限定するものではないが、例えば、穀物加工品（例、小麦粉加工品、デンプン類加工品、プレミックス加工品、麺類、マカロニ類、パン類、あん類、そば類、麩、ビーフン、はるさめ、包装餅等）、油脂加工品（例、可塑性油脂、てんぷら油、サラダ油、マヨネーズ類、ドレッシング等）、大豆加工品（例、豆腐類、味噌、納豆等）、食肉加工品（例、ハム、ベーコン、プレスハム、ソーセージ等）、水産製品（例、冷凍すりみ、かまぼこ、ちくわ、はんぺん、さつま揚げ、つみれ、すじ、魚肉ハム、ソーセージ、かつお節、魚卵加工品、水産缶詰、つくだ煮等）、乳製品（例、原料乳、クリーム、ヨーグル

ト、バター、チーズ、練乳、粉乳、アイスクリーム等）、野菜・果実加工品（例、ペースト類、ジャム類、漬物類、果実飲料、野菜飲料、ミックス飲料等）、菓子類（例、チョコレート、ビスケット類、菓子パン類、ケーキ、餅菓子、米菓類等）、アルコール類（例、日本酒、中国酒、ワイン、ウイスキー、焼酎、ウォッカ、ブランデー、ジン、ラム酒、ビール、清涼アルコール飲料、果実酒、リキュール等）、嗜好飲料（例、緑茶、紅茶、ウーロン茶、コーヒー、清涼飲料、乳酸飲料等）、調味料（例、しょうゆ、ソース、酢、みりん等）、缶詰・瓶詰・袋詰食品（例、牛飯、釜飯、赤飯、カレー、その他の各種調理済食品等）、半乾燥または濃縮食品（例、レバーペースト、その他のスプレッド、そば・うどんの汁、濃縮スープ類等）、乾燥食品（例、即席麺類、即席カレー、インスタントコーヒー、粉末ジュース、粉末スープ、即席味噌汁、調理済食品、調理済飲料、調理済スープ等）、冷凍食品（例、すき焼き、茶碗蒸し、うなぎかば焼き、ハンバーグステーキ、シュウマイ、餃子、各種スティック、フルーツカクテル等）、固形食品、液体食品（例、スープ等）、香辛料類等の農産・林産加工品、畜産加工品、水産加工品等が挙げられる。

本発明の飲食品中の有効成分の含有量としては、特に限定されるものではないが、通常、0.01～50重量%、好適には0.1～10重量%程度である。

本発明の飼料とは、例えば、家畜用、養殖魚用、家禽用、ペット用の飼料であり、本発明の化合物を含有する、ヒト以外の生物の人工食料又は飲料を意味する。飲料としては、家畜用等の飲料水が挙げられる。また、本発明の一態様としては、本発明の有効成分を含んでなるNGF産生増強用飼料添加剤が提供される。該添加剤は、例えば、通常の飼料に添加して、又は生物を浸漬する水中（養殖魚を養殖するための水中等）に添加して使用される。

本発明の飼料中の有効成分の含有量は、特に限定されるものではないが、通常、0.01～50重量%、好適には0.1～10重量%程度である。前記添加剤中の有効成分の含有量も特に限定されるものではなく、その用途に応じて所望の

効果が得られうるように適宜調節すればよい。

本発明の飼料（前記添加剤を含む）の形態は、特に限定されるものではなく、粉末状、液状又は固形状であってもよい。なお、有効成分として使用される化合物の塩としては、薬理学的に許容される塩が好ましい。

本発明において医薬、飲食品、飼料中の本発明の化合物含量は前記の通りであるが、その投与、摂取等により、生体内でNGF産生が増強される量であればよく、通常の飲食品中のソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物、及びグリチルリチンの含有量以上の量で高含有される。

本発明の有効成分である化合物に毒性は認められない。例えば、本発明で使用されるサポニン類化合物、グリチルリチン又はそれらの塩をマウス（雄性、6週齢）に経口投与（1000mg/kg体重）した場合、毒性は認められない。

また、本発明はNGF産生増強作用を有する上記一般式（I）で表される新規なソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物も提供する。その製造方法については上述の通りであるが、下記実施例により、より詳細に説明する。本発明の新規化合物は、当該実施例を参考に製造することができるが、これに限定されるものではない。

#### 実施例

以下、本発明を実施例をもって詳細に説明するが本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

##### 実施例1 大豆胚芽水抽出物由来フラクションの分画

（1）乾燥大豆胚芽9.6kgに蒸留水25リットルを加えて1時間浸漬した後、ブレンダーにて破碎を行った。つぎに、蒸留水40リットルを加えて2時間攪拌した後、5000gにて7分間遠心分離を行ない、沈殿1ならびに上清1（54リットル）を得た。沈殿1に蒸留水40リットルを加えて2時間攪拌した後



、5000gにて7分間遠心分離を行ない、沈殿2（19.7kg）ならびに上清2（36リットル）を得た。上清1および上清2を混合し、大豆胚芽水抽出液90Lを得た。

（2）実施例1－（1）で得られた大豆胚芽水抽出液90リットルに対し、エタノール39リットルを添加して攪拌の後、5000gにて7分間遠心分離を行ない、沈殿3ならびに上清3（90リットル）を得た。上清3をロータリーエバポレーターで18リットルに濃縮し、等量のエタノールを加えて攪拌後、5000gにて7分間遠心分離を行ない、沈殿4ならびに上清4（15リットル）を得た。上清4を濃縮し、大豆胚芽水抽出濃縮液1.7リットルを得た。

（3）実施例1－（2）で得られた大豆胚芽水抽出濃縮液110mLに蒸留水500mLを添加したものについて、逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。樹脂はコスモシール140 C18－OPN（ナカライテスク社製：樹脂量300mL）を用いた。展開溶媒としてそれぞれ1500mLの蒸留水、30％エタノール水溶液、50％エタノール水溶液、100％エタノールを用い、その順に溶出、分画を行ない、各大豆胚芽水抽出物由来コスモシール溶出画分を調製した。

（4）実施例1－（3）で得られた大豆胚芽水抽出物由来コスモシール30％エタノール溶出画分を減圧濃縮後、3倍量のアセトンを加えて攪拌し、5000gにて7分間遠心分離を行ない、沈殿5ならびに上清5を得た。

（5）実施例1－（4）で得られた上清5を濃縮乾固後、酢酸エチル：酢酸：水（容量比；以下、同じ）＝8：3：2（10mL）に溶解し、シリカクロマトを用いて分画した。以下にその条件について示す。シリカゲルにはBW－300SP（富士シリシア化学社製：樹脂量300mL）を用いた。展開溶媒として酢酸エチル：酢酸：水＝8：3：2（1000mL）、エタノール：水＝5：1（500mL）を用い、その順に溶出を行ない、画分0（300mL）、画分1（200mL）、画分2（200mL）、画分3（100mL）、画分4（150

mL)、画分5 (200 mL)、画分6 (120 mL)の順に溶出画分を得た。各溶出液を減圧濃縮後、各大豆胚芽水抽出物由来シリカカラム画分0～6を得た。

(6) 実施例1-(5)で得られた大豆胚芽水抽出物由来シリカカラム画分5を蒸留水60 mLに溶解し、ついで逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について述べる。カラムはTSK gel ODS-80Ts (21.5 mm×30 cm:東ソー社製)を用いた。溶媒A (蒸留水とアセトニトリルを容量比3対1で混合したもの)と溶媒B (蒸留水とアセトニトリルを容量比1対3で混合したもの)の溶出比は0～10分までは溶媒A比を100%に保持し、10～25分までは溶媒B比を直線的に0～30%に、つづく25～40分までは溶媒B比を直線的に30～100%に、つづく15分間は溶媒B比を100%に保持した。溶出速度は5 mL/分、検出は215 nmで行なった。溶出液の紫外線吸収を指標に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション1～21を分画した。

実施例2 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-O-[2-O-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol AのNGF産生増強活性

(1) 実施例1-(6)で分画した大豆胚芽水抽出物由来フラクション7 (保持時間32.4分の検出のピークを含むフラクション)の質量スペクトル(MS)を質量分析計(DX302:日本電子社製)によりFAB-MSの手法で測定した。マトリックスにはトリエタノールアミンを用いた。その結果、 $m/z$  1279 (M-H)<sup>-</sup>のピークを検出した。第1図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション7の質量スペクトルを示す。第1図において、横軸は $m/z$ 値、縦軸は相対強度を示す。

また、大豆胚芽水抽出物由来フラクション7を核磁気共鳴(NMR)スペクト

ル装置 (AVANCE 600 型: プルカ・バイオスピン社製) を用い、各種 NMR スペクトルを測定し構造解析した。以下に NMR の帰属の信号を示す。

<sup>1</sup>H-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  3.28 (1H, m, 3-H), 5.15 (1H, br-s, 12-H), 3.45 (1H, m, 21-H), 3.23 (1H, br-s, 22-H), 3.14 (1H, m, 24-H), 3.85 (1H, m, 24-H)

3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl moiety;  $\delta$  4.45 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1'-H), 3.44 (1H, m, 2'-H), 3.57 (1H, m, 3'-H), 3.32 (1H, m, 4'-H), 3.65 (1H, m, 5'-H)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  4.81 (1H, d,  $J=6.6$  Hz, 1''-H), 3.51 (1H, m, 2''-H), 3.51 (1H, m, 3''-H), 3.65 (1H, m, 4''-H), 3.38 (1H, m, 5''-H), 3.50 (2H, m, 6''-H)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  4.38 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'''-H), 3.02 (1H, m, 2'''-H), 3.17 (1H, m, 3'''-H), 3.08 (1H, m, 4'''-H), 3.14 (1H, m, 5'''-H), 3.46 (1H, m, 6'''-H), 3.73 (1H, m, 6'''-H)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  4.13 (1H, m, 1''''-H), 3.42 (1H, m, 2''''-H), 3.42 (1H, m, 3''''-H), 3.69 (1H, m, 4''''-H), 3.35 (1H, m, 5''''-H), 3.62 (1H, m, 5''''-H)

3'''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  4.57 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'''''-H), 4.52 (1H, m, 2'''''-H), 3.29 (1H, m, 3'''''-H), 3.37 (1H, m, 4'''''-H), 3.09 (1H, m, 5'''''-H), 3.72 (1H, m, 5'''''-H), 2.00 (3H, s, 2'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>1</sup>H-NMR においてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を 2.51 ppm として表した。第 2 図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 7 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを示す。第 2 図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

<sup>13</sup>C-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  90.3 (3-C), 122.5 (12-C), 144.4 (13-C), 74.7 (21-C), 92.0 (2

2-C), 63.0 (24-C)

3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  104.1 (1'-C), 79.0 (2'-C), 76.6 (3'-C), 71.9 (4'-C), 76.2 (5'-C), 171.0 (6'-C)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  101.6 (1''-C), 82.7 (2''-C), 73.4 (3''-C), 69.0 (4''-C), 75.5 (5''-C), 60.9 (6''-C)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  105.3 (1'''-C), 75.5 (2'''-C), 76.7 (3'''-C), 70.6 (4'''-C), 78.1 (5'''-C), 61.8 (6'''-C)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  108.0 (1''''-C), 71.9 (2''''-C), 83.0 (3''''-C), 68.5 (4''''-C), 67.0 (5''''-C)

3''''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  103.3 (1'''''-C), 74.6 (2'''''-C), 74.7 (3'''''-C), 70.2 (4'''''-C), 65.3 (5'''''-C), 170.5 (2'''''-C=O), 21.8 (2'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>13</sup>C-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40.2 ppmとして表した。第3図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション7の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。第3図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション7を1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（ジオキサンと水との容量比1：3の溶液）と混合し、80℃、4時間加温し、糖成分と非糖成分を生じさせた。非糖部分について薄層クロマトグラフィー（メルク社製Silica gel 60 F254、展開溶媒A：クロロホルムとメタノールを10：1で混合）を行った結果、Soyasapogenol Aと同じRf値を有するスポットを検出した。糖成分について薄層クロマトグラフィー（展開溶媒B：水とアセトニトリルを3：17で混合）を行った結果、アラビノース、グルコース、キシロース、ガラクトースを検出した。

以上、大豆胚芽水抽出物由来フラクション7について行った質量スペクトル、NMRスペクトル解析、ならびに酸加水分解後の非糖成分と糖成分の解析により、大豆胚芽水抽出物由来フラクション7が3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -

D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]-22-O-[2-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl(1→3)-α-L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A (分子量 1280)であることを確定した。なお、当該化合物は上記表1における化合物aである。

(2) 化合物aのNGF産生増強活性を測定した。マウス繊維芽細胞L-M細胞(ATCC CCL-1.2)を0.5%のバクトペプトン(ギブコ社製)を含むM199培地(バイオウィタカ社製)で $1.5 \times 10^5$ 細胞/mLに懸濁し、96穴プレートに0.1mLずつまき無菌的に培養した。3日間培養後、培地を取り除き、0.5%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を含むM199培地に置き換えた。これに化合物aを添加し、20時間培養した。培養終了後、培養液中のNGFの濃度をエンザイムイムノアッセイ法(NGF Emax Immuno Assay System:プロメガ社製)にて測定した。添加量は最終濃度で表2に示す通りとした。実験は2連で行い、その平均値を採用した。その結果、化合物aにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表2にその結果を示す。なお、コントロールのNGF産生量は0.739 ng/mLであった。コントロールは、化合物aを添加しないこと以外は同様にして培養液中の濃度を測定した。以下、同様である。

実施例3 3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]-22-O-[3-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl(1→3)-α-L-arabinopyranosyl]soyasapogenol AのNGF産生増強活性

(1) 実施例1-(6)で分画した大豆胚芽水抽出物由来フラクション9(保持時間34.2分の検出のピークを含むフラクション)の質量スペクトルを実施例2-(1)と同様の方法で測定した。マトリックスにはトリエタノールアミンを用いた。質量分析により $m/z$  1279 (M-H)<sup>-</sup>のピークを検出した。第4図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション9の質量スペクトルを示す。第4

図において、横軸は $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション 9 の NMR スペクトルを実施例 2 - (1) と同様の方法で測定した。NMR の帰属の信号を以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$  :

sapogenol moiety;  $\delta$  3. 27 (1H, m, 3-H), 5. 14 (1H, br-s, 12-H), 3. 39 (1H, m, 21-H), 3. 24 (1H, br-s, 22-H), 3. 14 (1H, m, 24-H), 3. 86 (1H, m, 24-H)

3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  4. 45 (1H, m, 1'-H), 3. 43 (1H, m, 2'-H), 3. 57 (1H, m, 3'-H), 3. 33 (1H, t,  $J=9.7$  Hz, 4'-H), 3. 65 (1H, m, 5'-H)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  4. 80 (1H, d,  $J=6.6$  Hz, 1''-H), 3. 51 (1H, m, 2''-H), 3. 51 (1H, m, 3''-H), 3. 65 (1H, m, 4''-H), 3. 38 (1H, m, 5''-H), 3. 50 (2H, m, 6''-H)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  4. 37 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'''-H), 3. 03 (1H, dd,  $J=7.8, 9.0$  Hz, 2'''-H), 3. 17 (1H, t,  $J=9.0$  Hz, 3'''-H), 3. 07 (1H, t,  $J=9.0$  Hz, 4'''-H), 3. 15 (1H, m, 5'''-H), 3. 47 (1H, m, 6'''-H), 3. 73 (1H, m, 6'''-H)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  4. 22 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1''''-H), 3. 55 (1H, m, 2''''-H), 3. 51 (1H, m, 3''''-H), 3. 75 (1H, m, 4''''-H), 3. 40 (1H, m, 5''''-H), 3. 63 (1H, m, 5''''-H)

3''''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  4. 47 (1H, m, 1'''''-H), 3. 23 (1H, m, 2'''''-H), 4. 72 (1H, t,  $J=9.3$  Hz, 3'''''-H), 3. 48 (1H, m, 4'''''-H), 3. 18 (1H, m, 5'''''-H), 3. 74 (1H, m, 5'''''-H), 2. 03 (3H, s, 3'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、 $^1\text{H-NMR}$  においてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を 2. 51 ppm として表した。第 5 図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 9 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルを示す。第 5 図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

$^{13}\text{C}$ -NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  90.4 (3-C), 122.5 (12-C), 144.4 (13-C), 75.0 (21-C), 92.3 (22-C), 63.0 (24-C)

3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl moiety;  $\delta$  104.1 (1'-C), 78.9 (2'-C), 76.7 (3'-C), 72.0 (4'-C), 76.1 (5'-C), 171.0 (6'-C)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  101.6 (1''-C), 82.7 (2''-C), 73.4 (3''-C), 69.0 (4''-C), 75.7 (5''-C), 61.0 (6''-C)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  105.3 (1'''-C), 75.5 (2'''-C), 76.8 (3'''-C), 70.6 (4'''-C), 78.1 (5'''-C), 61.8 (6'''-C)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  107.4 (1''''-C), 71.9 (2''''-C), 83.7 (3''''-C), 68.5 (4''''-C), 67.0 (5''''-C)

3''''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  105.6 (1'''''-C), 72.2 (2'''''-C), 77.8 (3'''''-C), 68.1 (4'''''-C), 66.3 (5'''''-C), 170.8 (3'''''-C=O), 21.9 (3'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、 $^{13}\text{C}$ -NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40.2 ppmとして表した。第6図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション9の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。第6図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション9を実施例2-(1)と同様の方法で加水分解に処し、糖成分と非糖成分を生じさせた。非糖部分について薄層クロマトグラフィー（展開溶媒A）を行った結果、Soyasapogenol Aと同じRf値を有するスポットを検出した。糖成分について薄層クロマトグラフィー（展開溶媒B）を行った結果、アラビノース、グルコース、キシロース、ガラクトースを検出した。

以上の結果より、大豆胚芽水抽出物由来フラクション9が3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-O-[3-O-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol

A (分子量 1280) であることを確定した。なお、当該化合物は上記表 1 における化合物 b である。

(2) 化合物 b の NGF 産生増強活性を実施例 2 - (2) と同様の方法で測定した。その結果、化合物 b に NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 2 にその結果を示す。なお、コントロールの NGF 産生量は 0.739 ng/mL であった。

実施例 4 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-O-[4-O-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A の NGF 産生増強活性

(1) 実施例 1 - (6) で分画した大豆胚芽水抽出物由来フラクション 10 (保持時間 35.6 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトルを実施例 2 - (1) と同様の方法で測定した。マトリックスにはトリエタノールアミンを用いた。質量分析により  $m/z$  1279 ( $M-H$ )<sup>-</sup> のピークを検出した。第 7 図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 10 の質量スペクトルを示す。第 7 図において、横軸は  $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション 10 の NMR スペクトルを実施例 2 - (1) と同様の方法で測定した。NMR の帰属の信号を以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  3.26 (1H, m, 3-H), 5.15 (1H, br-s, 12-H), 3.39 (1H, m, 21-H), 3.23 (1H, br-s, 22-H), 3.15 (1H, m, 24-H), 3.86 (1H, m, 24-H)  
 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl moiety;  $\delta$  4.46 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1'-H), 3.43 (1H, m, 2'-H), 3.56 (1H, m, 3'-H), 3.33 (1H, m, 4'-H), 3.65 (1H, m, 5'-H)  
 2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  4.81 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1''-H), 3.51 (1H, m, 2''-H), 3.51 (1H, m, 3''-H), 3.65 (1H, m, 4''-H), 3.38 (1H, m, 5''-H), 3.50 (2H, m, 6''-H)



2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  4.38 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'''-H), 3.02 (1H, m, 2''-H), 3.16 (1H, m, 3'''-H), 3.08 (1H, m, 4'''-H), 3.15 (1H, m, 5'''-H), 3.47 (1H, m, 6'''-H), 3.73 (1H, m, 6'''-H)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  4.22 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1''''-H), 3.57 (1H, m, 2''''-H), 3.46 (1H, m, 3''''-H), 3.74 (1H, m, 4''''-H), 3.39 (1H, m, 5''''-H), 3.62 (1H, m, 5''''-H)

3'''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  4.43 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1'''''-H), 3.39 (1H, m, 2'''-H), 3.18 (1H, m, 3'''''-H), 4.53 (1H, m, 4'''''-H), 3.17 (1H, m, 5'''''-H), 3.78 (1H, m, 5'''''-H), 2.01 (3H, s, 4'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>1</sup>H-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.51 ppmとして表した。第8図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション10の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第8図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

#### <sup>13</sup>C-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  90.3 (3-C), 122.5 (12-C), 144.4 (13-C), 75.0 (21-C), 92.4 (22-C), 63.0 (24-C)

3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  104.1 (1'-C), 78.8 (2'-C), 76.5 (3'-C), 71.9 (4'-C), 76.2 (5'-C), 171.0 (6'-C)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  101.5 (1''-C), 82.7 (2''-C), 73.3 (3''-C), 69.0 (4''-C), 75.7 (5''-C), 60.9 (6''-C)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  105.3 (1'''-C), 75.5 (2'''-C), 76.8 (3'''-C), 70.6 (4'''-C), 78.1 (5'''-C), 61.8 (6'''-C)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  107.5 (1''''-C), 71.8 (2''''-C), 83.9 (3''''-C), 68.4 (4''''-C), 67.0 (5''''-C)

3'''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  105.9 (1''''-C), 73.3 (2''''-C), 74.5 (3''''-C), 72.3 (4''''-C), 62.8 (5''''-C), 171.0 (4''''-C=O), 21.7 (4''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>13</sup>C-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40.2 ppmとして表した。第9図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション10の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。第9図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション10を実施例2-(1)と同様の方法で加水分解に処し、糖成分と非糖成分を生じさせた。非糖部分について薄層クロマトグラフィー(展開溶媒A)を行った結果、Soyasapogenol Aと同じRf値を有するスポットを検出した。糖成分について薄層クロマトグラフィー(展開溶媒B)を行った結果、アラビノース、グルコース、キシロース、ガラクトースを検出した。

以上の結果より、大豆胚芽水抽出物由来フラクション10が3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-O-[4-O-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A(分子量1280)であることを確定した。なお、当該化合物は上記表1における化合物cである。

(2) 化合物cのNGF産生増強活性を実施例2-(2)と同様の方法で測定した。その結果、化合物cにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表2にその結果を示す。なお、コントロールのNGF産生量は0.739 ng/mLであった。

実施例5 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-O-[2,3-di-O-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol AのNGF産生増強活性

(1) 実施例1-(6)で分画した大豆胚芽水抽出物由来フラクション12(

保持時間 3.8 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトルを実施例 2-(1) と同様の方法で測定した。マトリックスには *m*-ニトロベンジルアルコールを用いた。質量分析により  $m/z$  1321 ( $M-H$ )<sup>-</sup> のピークを検出した。第 10 図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 12 の質量スペクトルを示す。第 10 図において、横軸は  $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション 12 の NMR スペクトルを実施例 2-(1) と同様の方法で測定した。NMR の帰属の信号を以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  3.26 (1H, m, 3-H), 5.14 (1H, br-s, 12-H), 3.43 (1H, m, 21-H), 3.23 (1H, br-s, 22-H), 3.15 (1H, m, 24-H), 3.86 (1H, m, 24-H)

3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  4.46 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'-H), 3.44 (1H, m, 2'-H), 3.56 (1H, m, 3'-H), 3.33 (1H, m, 4'-H), 3.65 (1H, m, 5'-H)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  4.80 (1H, d,  $J=6.6$  Hz, 1''-H), 3.50 (1H, m, 2''-H), 3.51 (1H, m, 3''-H), 3.65 (1H, m, 4''-H), 3.38 (1H, m, 5''-H), 3.50 (2H, m, 6''-H)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  4.37 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'''-H), 3.03 (1H, m, 2'''-H), 3.17 (1H, m, 3'''-H), 3.08 (1H, m, 4'''-H), 3.14 (1H, m, 5'''-H), 3.47 (1H, m, 6'''-H), 3.73 (1H, m, 6'''-H)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  4.15 (1H, d,  $J=6.6$  Hz, 1''''-H), 3.42 (1H, m, 2''''-H), 3.45 (1H, m, 3''''-H), 3.71 (1H, m, 4''''-H), 3.35 (1H, m, 5''''-H), 3.62 (1H, m, 5''''-H)

3'''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  4.74 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1'''''-H), 4.65 (1H, m, 2'''''-H), 4.83 (1H, t,  $J=7.2$  Hz, 3'''''-H), 3.60 (1H, m, 4'''''-H), 3.82 (1H, m, 5'''''-H), 3.24 (1H, m, 5'''''-H), 1.95 (3H, s, 2'''''-CH<sub>3</sub>), 1.98 (3H, s, 3'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>1</sup>H-NMR においてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を 2.51 ppm として

表した。第11図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション12の $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。第11図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

$^{13}\text{C}$ -NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  90.3(3-C), 122.5(12-C), 144.4(13-C), 74.8(21-C), 91.8(22-C), 63.0(24-C)

3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  104.1(1'-C), 79.0(2'-C), 76.6(3'-C), 71.9(4'-C), 76.1(5'-C), 171.0(6'-C)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  101.5(1''-C), 82.7(2''-C), 73.3(3''-C), 69.0(4''-C), 75.8(5''-C), 60.9(6''-C)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  105.3(1'''-C), 75.5(2'''-C), 76.7(3'''-C), 70.6(4'''-C), 78.1(5'''-C), 61.8(6'''-C)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  107.9(1''''-C), 72.0(2''''-C), 83.5(3''''-C), 68.4(4''''-C), 67.0(5''''-C)

3'''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  102.8(1''''-C), 72.4(2''''-C), 76.0(3''''-C), 68.0(4''''-C), 66.0(5''''-C), 170.4(2''''-C=O), 21.5(2''''-CH<sub>3</sub>), 170.7(3''''-C=O), 21.5(3''''-CH<sub>3</sub>)

但し、 $^{13}\text{C}$ -NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40.2 ppmとして表した。第12図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション12の $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。第12図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション12を実施例2-(1)と同様の方法で加水分解に処し、糖成分と非糖成分を生じさせた。非糖部分について薄層クロマトグラフィー(展開溶媒A)を行った結果、Soyasapogenol Aと同じRf値を有するスポットを検出した。糖成分について薄層クロマトグラフィー

(展開溶媒B)を行った結果、アラビノース、グルコース、キシロース、ガラクトースを検出した。

以上の結果より、大豆胚芽水抽出物由来フラクション12が3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-*O*-[2,3-di-*O*-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A(分子量1322)であることを確定した。なお、当該化合物は上記表1における化合物dである。

(2) 化合物dのNGF産生増強活性を実施例2-(2)と同様の方法で測定した。その結果、化合物dにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表2にその結果を示す。なお、コントロールのNGF産生量は0.739 ng/mLであった。

実施例6 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-*O*-[2,4-di-*O*-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol AのNGF産生増強活性

(1) 実施例1-(6)で分画した大豆胚芽水抽出物由来フラクション13(保持時間38.9分の検出のピークを含むフラクション)の質量スペクトルを実施例2-(1)と同様の方法で測定した。マトリックスには*m*-ニトロベンジルアルコールを用いた。質量分析により*m/z* 1321 (*M*-H)<sup>-</sup>のピークを検出した。第13図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション13の質量スペクトルを示す。第13図において、横軸は*m/z*値、縦軸は相対強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション13のNMRスペクトルを実施例2-(1)と同様の方法で測定した。NMRの帰属の信号を以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  3.27 (1H, m, 3-H), 5.14 (1H, br-s, 12-H), 3.45 (1H, m, 21-H), 3.2

2 (1H, br-s, 22-H), 3.12 (1H, m, 24-H), 3.85 (1H, m, 24-H)  
 3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  4.46 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1'-H), 3.43 (1H, m, 2'-H), 3.57 (1H, m, 3'-H), 3.33 (1H, m, 4'-H), 3.64 (1H, m, 5'-H)  
 2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  4.81 (1H, d,  $J=6.6$  Hz, 1''-H), 3.51 (1H, m, 2''-H), 3.51 (1H, m, 3''-H), 3.64 (1H, m, 4''-H), 3.38 (1H, m, 5''-H), 3.50 (2H, m, 6''-H)  
 2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  4.38 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'''-H), 3.02 (1H, m, 2'''-H), 3.17 (1H, m, 3'''-H), 3.08 (1H, m, 4'''-H), 3.14 (1H, m, 5'''-H), 3.47 (1H, m, 6'''-H), 3.72 (1H, m, 6'''-H)  
 22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  4.15 (1H, d, 1''''-H), 3.44 (1H, m, 2''''-H), 3.43 (1H, m, 3''''-H), 3.69 (1H, m, 4''''-H), 3.35 (1H, m, 5''''-H), 3.60 (1H, m, 5''''-H)  
 3'''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  4.70 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1''''-H), 4.62 (1H, m, 2''''-H), 3.60 (1H, m, 3''''-H), 4.59 (1H, m, 4''''-H), 3.27 (1H, m, 5''''-H), 3.90 (1H, m, 5''''-H), 2.02 (3H, s, 2''''-CH<sub>3</sub>), 2.02 (3H, s, 4''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>1</sup>H-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.51 ppmとして表した。第14図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション13の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第14図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

<sup>13</sup>C-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  90.3 (3-C), 122.5 (12-C), 144.4 (13-C), 74.8 (21-C), 91.8 (22-C), 63.0 (24-C)  
 3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  104.1 (1'-C), 78.7 (2'-C), 76.6 (3'-C), 71.9 (4'-C), 76.1 (5'-C), 171.0 (6'-C)  
 2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  101.5 (1''-C), 82.7 (2''-C), 73.3 (3''-C), 69.0 (4''-C), 75.5 (5''-C), 60.9 (6''-C)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  105.3 (1'''-C), 75.5 (2'''-C), 76.7 (3'''-C), 70.6 (4'''-C), 78.1 (5'''-C), 61.8 (6'''-C)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  108.0 (1''''-C), 71.9 (2''''-C), 83.0 (3''''-C), 68.2 (4''''-C), 67.0 (5''''-C)

3''''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  102.6 (1'''''-C), 73.7 (2'''''-C), 70.6 (3'''''-C), 71.6 (4'''''-C), 62.0 (5'''''-C), 170.4, 170.9 (2'''''および4'''''-C=O), 21.6, 21.8 (2'''''および4'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>13</sup>C-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40.2 ppmとして表した。第15図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション13の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。第15図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション13を実施例2-(1)と同様の方法で加水分解に処し、糖成分と非糖成分を生じさせた。非糖部分について薄層クロマトグラフィー（展開溶媒A）を行った結果、Soyasapogenol Aと同じR<sub>f</sub>値を有するスポットを検出した。糖成分について薄層クロマトグラフィー（展開溶媒B）を行った結果、アラビノース、グルコース、キシロース、ガラクトースを検出した。

以上の結果より、大豆胚芽水抽出物由来フラクション13が3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-O-[2,4-di-O-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl (1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A（分子量1322）であることを確定した。なお、当該化合物は上記表1における化合物eである。

(2) 化合物eのNGF産生増強活性を実施例2-(2)と同様の方法で測定した。その結果、化合物eにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表2にその結果を示す。なお、コントロールのNGF産生量は0.578 ng/mLであった。

実施例 7 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-O-[3,4-di-O-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol AのNGF産生増強活性

(1) 実施例 1 - (6) で分画した大豆胚芽水抽出物由来フラクション 15 (保持時間 40.3 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトルを実施例 2 - (1) と同様の方法で測定した。マトリックスには *m*-ニトロベンジルアルコールを用いた。質量分析により *m/z* 1321 (*M*-H)<sup>-</sup> のピークを検出した。第 16 図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 15 の質量スペクトルを示す。第 16 図において、横軸は *m/z* 値、縦軸は相対強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション 15 の NMR スペクトルを実施例 2 - (1) と同様の方法で測定した。NMR の帰属の信号を以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  3.27 (1H, m, 3-H), 5.14 (1H, br-s, 12-H), 3.39 (1H, m, 21-H), 3.24 (1H, br-s, 22-H), 3.14 (1H, m, 24-H), 3.85 (1H, m, 24-H)

3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl moiety;  $\delta$  4.45 (1H, d, *J*=7.8 Hz, 1'-H), 3.43 (1H, m, 2'-H), 3.56 (1H, t, *J*=8.9 Hz, 3'-H), 3.34 (1H, t, *J*=8.9 Hz, 4'-H), 3.66 (1H, m, 5'-H)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  4.80 (1H, d, *J*=6.6 Hz, 1''-H), 3.51 (1H, m, 2''-H), 3.51 (1H, m, 3''-H), 3.65 (1H, m, 4''-H), 3.38 (1H, m, 5''-H), 3.50 (2H, m, 6''-H)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  4.37 (1H, d, *J*=7.8 Hz, 1'''-H), 3.02 (1H, dd, *J*=7.8, 9.0 Hz, 2'''-H), 3.17 (1H, t, *J*=9.0 Hz, 3'''-H), 3.08 (1H, t, *J*=9.0 Hz, 4'''-H), 3.15 (1H, m, 5'''-H), 3.47 (1H, m, 6'''-H), 3.72 (1H, m, 6'''-H)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  4.22 (1H, d, *J*=4.8 Hz, 1''''-H), 3.46 (1H, m, 2''''-H), 3.42 (1H, m, 3''''-H), 3.74 (1H, m, 4''''-H), 3.39 (1H, m, 5''''-H), 3.63 (1H, m, 5''''-H)



3'''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  4.58 (1H, d,  $J=7.2$  Hz, 1'''-H), 3.38 (1H, m, 2'''-H), 4.97 (1H, t,  $J=9.3$  Hz, 3'''-H), 4.72 (1H, m, 4'''-H), 3.88 (1H, m, 5'''-H), 3.36 (1H, m, 5'''-H), 2.01, 1.96 (3H, s, 3'''および4'''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>1</sup>H-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.51 ppmとして表した。第17図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション15の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第17図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

<sup>13</sup>C-NMR:  $\delta$

sapogenol moiety;  $\delta$  90.3 (3-C), 122.5 (12-C), 144.4 (13-C), 75.0 (21-C), 92.3 (22-C), 62.6 (24-C)

3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  104.1 (1'-C), 78.8 (2'-C), 76.5 (3'-C), 72.0 (4'-C), 76.1 (5'-C), 171.0 (6'-C)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  101.5 (1''-C), 82.7 (2''-C), 73.4 (3''-C), 69.0 (4''-C), 75.5 (5''-C), 60.9 (6''-C)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  105.3 (1'''-C), 75.5 (2'''-C), 76.5 (3'''-C), 70.6 (4'''-C), 78.1 (5'''-C), 61.8 (6'''-C)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  107.4 (1''''-C), 72.0 (2''''-C), 83.7 (3''''-C), 68.3 (4''''-C), 67.0 (5''''-C)

3'''-O- $\beta$ -D-xylopyranosyl moiety;  $\delta$  105.3 (1'''''-C), 72.0 (2'''''-C), 74.2 (3'''''-C), 69.9 (4'''''-C), 62.6 (5'''''-C), 171.0, 170.7 (3'''''および4'''''-C=O), 21.3, 21.5 (3'''''および4'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>13</sup>C-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40.2 ppmとして表した。第18図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション15の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを

示す。第18図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション15を実施例2-(1)と同様の方法で加水分解に処し、糖成分と非糖成分を生じさせた。非糖部分について薄層クロマトグラフィー(展開溶媒A)を行った結果、Soyasapogenol Aと同じR<sub>f</sub>値を有するスポットを検出した。糖成分について薄層クロマトグラフィー(展開溶媒B)を行った結果、アラビノース、グルコース、キシロース、ガラクトースを検出した。

その結果から、大豆胚芽水抽出物由来フラクション15が3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]-22-O-[3,4-di-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl(1→3)-α-L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A(分子量1322)であることを確定した。なお、当該化合物は上記表1における化合物fである。

(2) 化合物fのNGF産生増強活性を実施例2-(2)と同様の方法で測定した。その結果、化合物fにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表2にその結果を示す。なお、コントロールのNGF産生量は0.578 ng/mLであった。

実施例8 3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]-22-O-[3,4,6-tri-O-acetyl-β-D-glucopyranosyl(1→3)-α-L-arabinopyranosyl]soyasapogenol AのNGF産生増強活性

(1) 実施例1-(6)で分画した大豆胚芽水抽出物由来フラクション16(保持時間41.0分の検出のピークを含むフラクション)の質量スペクトルを実施例2-(1)と同様の方法で測定した。マトリックスにはm-ニトロベンジルアルコールを用いた。質量分析によりm/z 1393 (M-H)<sup>-</sup>のピークを検出した。第19図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション16の質量スペクトルを示す。第19図において、横軸はm/z値、縦軸は相対強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション16のNMRスペクトルを実施例2-(1)と同様の方法で測定した。NMRの帰属の信号を以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  3.28 (1H, m, 3-H), 5.15 (1H, br-s, 12-H), 3.40 (1H, m, 21-H), 3.25 (1H, br-s, 22-H), 3.15 (1H, m, 24-H), 3.87 (1H, m, 24-H)

3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  4.45 (1H, d, 1'-H), 3.44 (1H, m, 2'-H), 3.57 (1H, m, 3'-H), 3.32 (1H, m, 4'-H), 3.62 (1H, m, 5'-H)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  4.82 (1H, d, 1''-H), 3.51 (1H, m, 2''-H), 3.51 (1H, m, 3''-H), 3.65 (1H, m, 4''-H), 3.38 (1H, m, 5''-H), 3.50 (2H, m, 6''-H)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  4.38 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'''-H), 3.02 (1H, m, 2'''-H), 3.17 (1H, m, 3'''-H), 3.09 (1H, m, 4'''-H), 3.14 (1H, m, 5'''-H), 3.47 (1H, m, 6'''-H), 3.72 (1H, m, 6'''-H)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  4.25 (1H, d, 1''''-H), 3.59 (1H, m, 2''''-H), 3.52 (1H, m, 3''''-H), 3.78 (1H, m, 4''''-H), 3.42 (1H, m, 5''''-H), 3.66 (1H, m, 5''''-H)

3'''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  4.67 (1H, d,  $J=7.8$  Hz, 1'''''-H), 3.41 (1H, dd,  $J=7.8, 9.3$  Hz, 2'''''-H), 5.03 (1H, t,  $J=9.3$  Hz, 3'''''-H), 4.77 (1H, t,  $J=9.3$  Hz, 4'''''-H), 3.87 (1H, m, 5'''''-H), 3.97 (1H, m, 6'''''-H), 4.17 (1H, m, 6'''''-H), 1.96, 1.99 (3H および 6H, s, 3''''', 4'''''および6'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>1</sup>H-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.51 ppmとして表した。第20図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション16の<sup>1</sup>H-NMRスペクトルを示す。第20図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

<sup>13</sup>C-NMR :

sapogenol moiety;  $\delta$  90.3 (3-C), 122.5 (12-C), 144.4 (13-C), 75.0 (21-C), 92.4 (22-C), 63.0 (24-C)

3-O- $\beta$ -D-glucronopyranosyl moiety;  $\delta$  104.1 (1'-C), 78.8 (2'-C), 76.6 (3'-C), 72.0 (4'-C), 76.0 (5'-C), 171.0 (6'-C)

2'-O- $\beta$ -D-galactopyranosyl moiety;  $\delta$  101.5 (1''-C), 82.8 (2''-C), 73.2 (3''-C), 69.0 (4''-C), 75.7 (5''-C), 60.9 (6''-C)

2''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  105.3 (1'''-C), 75.5 (2'''-C), 76.7 (3'''-C), 70.6 (4'''-C), 78.1 (5'''-C), 61.8 (6'''-C)

22-O- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl moiety;  $\delta$  107.4 (1''''-C), 71.6 (2''''-C), 84.4 (3''''-C), 68.3 (4''''-C), 67.0 (5''''-C)

3''''-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl moiety;  $\delta$  104.7 (1'''''-C), 72.2 (2'''''-C), 75.0 (3'''''-C), 69.4 (4'''''-C), 71.3 (5'''''-C), 62.8 (6'''''-C), 170.3, 170.5, 171.1 (3''''', 4''''', および 6'''''-C=O), 21.3, 21.4, 21.5 (3''''', 4''''', および 6'''''-CH<sub>3</sub>)

但し、<sup>13</sup>C-NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40.2 ppmとして表した。第21図に、大豆胚芽水抽出物由来フラクション16の<sup>13</sup>C-NMRスペクトルを示す。第21図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

大豆胚芽水抽出物由来フラクション16を実施例2-(1)と同様の方法で加水分解に処し、糖成分と非糖成分を生じさせた。非糖部分について薄層クロマトグラフィー（展開溶媒A）を行った結果、Soyasapogenol Aと同じR<sub>f</sub>値を有するスポットを検出した。糖成分について薄層クロマトグラフィー（展開溶媒B）を行った結果、アラビノース、グルコース、ガラクトースを検出した。

以上の結果から、大豆胚芽水抽出物由来フラクション16が3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-

0-[3, 4, 6-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A (分子量 1 3 9 4)であることを確定した。なお、当該化合物は上記表 1 における化合物 g である。

(2) 化合物 g の NGF 産生増強活性を実施例 2 - (2) と同様の方法で測定した。その結果、化合物 g に NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 2 にその結果を示す。なお、コントロールの NGF 産生量は 0. 7 3 9 n g / mL であった。

実施例 9 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-*O*-[2, 3, 4, 6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A の NGF 産生増強活性

(1) 実施例 1 - (6) で分画した大豆胚芽水抽出物由来フラクション 1 8 (保持時間 4 2. 7 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトル、NMR スペクトル、糖部分及び非糖部分の薄層クロマトグラフィーを実施例 2 - (1) と同様の方法で測定した。その結果、大豆胚芽水抽出物由来フラクション 1 8 が 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-*O*-[2, 3, 4, 6-tetra-*O*-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A (分子量 1 4 3 6) であることを確定した。なお、当該化合物は上記表 1 における化合物 h である。

(2) 化合物 h の NGF 産生増強活性を実施例 2 - (2) と同様の方法で測定した。その結果、化合物 h に NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 2 にその結果を示す。なお、コントロールの NGF 産生量は 0. 8 9 8 n g / mL であった。

実施例 1 0 大豆胚芽 7 0 % エタノール抽出物由来フラクションの分画

(1) 実施例 1 - (1) で得られた沈殿 2 (5. 6 k g) に 8. 4 リットルの

エタノールを加え、室温、1時間攪拌した後、5000gにて10分間遠心分離を行ない、沈殿6ならびに上清6を得た。沈殿6に70%エタノール10リットルを加えて1時間攪拌した後、5000gにて10分間遠心分離を行ない、沈殿7ならびに上清7を得た。上清6および上清7を混合して減圧濃縮し、大豆胚芽70%エタノール抽出濃縮物を得た。

(2) 実施例10-(1)で得られた大豆胚芽70%エタノール抽出濃縮物を500mLの70%エタノールに溶解した後、5000gにて10分間遠心分離を行ない、沈殿8ならびに上清8を得た。上清8を減圧濃縮後、1000mLの蒸留水に懸濁し、ろ過後の残さを大豆胚芽70%エタノール抽出物由来水不溶性画分として得た。

(3) 実施例10-(2)で得られた大豆胚芽70%エタノール抽出物由来水不溶性画分の0.4容を2mLメタノール、10mLクロロホルムからなる溶媒に溶解し、シリカカラムを用いた分画を行なった。以下にその条件について示す。シリカゲルにはBW-300SP(樹脂量300mL)を用いた。展開溶媒としてクロロホルム：メタノール：酢酸=100：20：1(400mL)、クロロホルム：メタノール=2：1(400mL)、エタノール：水=10：1(200mL)を用い、その順に溶出を行ない、画分1～10まで100mLごとに画分を回収した。各溶出画分を減圧濃縮し、70%エタノール抽出物由来シリカカラム画分1～10を得た。

(4) 実施例10-(3)で得られた70%エタノール抽出物由来シリカカラム画分4、5を合わせて濃縮後、エタノール12mLに溶解し、ついで逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について述べる。カラムはTSK gel ODS-80Ts(21.5mm×30cm)を用いた。溶媒A(蒸留水とアセトニトリルを容量比3対1で混合したもの)と溶媒B(蒸留水とアセトニトリルを容量比1対3で混合したもの)の溶出比は0～25分までは溶媒B比を直線的に40～70%に、つづく25～26分までは溶媒B比を直線

的に70～100%に、つづく5分間は溶媒B比を100%に保持した。溶出速度は5mL/分、検出は215nmで行なった。溶出液の紫外線吸収を指標に、大豆胚芽70%エタノール抽出物由来フラクション1～10を分画した。

実施例11 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogenol BのNGF産生増強活性

(1) 実施例10-(4)で分画した大豆胚芽70%エタノール抽出物由来フラクション6(保持時間24.8分の検出のピークを含むフラクション)の質量スペクトル、NMRスペクトルを実施例2-(1)と同様の方法で行った。また、大豆胚芽70%エタノール抽出物由来フラクション6を2M トリフルオロ酢酸:2N HCl(1:1)の混液にて気相下、100℃、4時間加温し、糖成分と非糖成分を生じさせた。非糖部分について薄層クロマトグラフィー(展開溶媒A)を行った結果、Soyasapogenol Bと同じRf値を有するスポットを検出した。糖成分について薄層クロマトグラフィー(展開溶媒B)を行った結果、グルコース、ガラクトースを検出した。その結果、大豆胚芽70%エタノール抽出物由来フラクション6が3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogenol B(分子量958)であることを確定した。なお、当該化合物は上記表1における化合物iである。

(2) 化合物iのNGF産生増強活性を実施例2-(2)と同様の方法で測定した。その結果、化合物iにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表2にその結果を示す。なお、コントロールのNGF産生量は0.948ng/mLであった。

実施例12 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogenol BのNGF産生増強活性

(1) 実施例 10 - (4) で分画した大豆胚芽 70%エタノール抽出物由来フラクション 7 (保持時間 27.4 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトル、NMR スペクトル、糖部分及び非糖部分の薄層クロマトグラフィーを実施例 11 - (1) と同様の方法で測定した。その結果、大豆胚芽 70%エタノール抽出物由来フラクション 7 が 3-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogenol B (分子量 942) であることを確定した。なお、当該化合物は上記表 1 における化合物 j である。

(2) 化合物 j の NGF 産生増強活性を実施例 2 - (2) と同様の方法で測定した。その結果、化合物 j に NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 2 にその結果を示す。なお、コントロールの NGF 産生量は 0.948 ng/mL であった。

実施例 13 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogenol E の NGF 産生増強活性

(1) 実施例 10 - (4) で分画した大豆胚芽 70%エタノール抽出物由来フラクション 8 (保持時間 29.3 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトル、NMR スペクトル、糖部分及び非糖部分の薄層クロマトグラフィーを実施例 11 - (1) と同様の方法で測定した。その結果、大豆胚芽 70%エタノール抽出物由来フラクション 8 が 3-O-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogenol E (分子量 956) であることを確定した。なお、当該化合物は上記表 1 における化合物 k である。

(2) 化合物 k の NGF 産生増強活性を実施例 2 - (2) と同様の方法で測定した。その結果、化合物 k に NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 2 にその結果を示す。なお、コントロールの NGF 産生量は 0.924 ng/mL であった。



実施例 14 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogenol EのNGF産生増強活性

(1) 実施例 10-(4) で分画した大豆胚芽 70%エタノール抽出物由来フラクション 9 (保持時間 31.7 分の検出のピークを含むフラクション) の質量スペクトル、NMR スペクトル、糖部分及び非糖部分の薄層クロマトグラフィーを実施例 11-(1) と同様の方法で測定した。その結果、大豆胚芽 70%エタノール抽出物由来フラクション 9 が 3-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-soyasapogenol E (分子量 940) であることを確定した。なお、当該化合物は上記表 1 における化合物 1 である。

(2) 化合物 1 の NGF 産生増強活性を実施例 2-(2) と同様の方法で測定した。その結果、化合物 1 に NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 2 にその結果を示す。なお、コントロールの NGF 産生量は 0.924 ng/mL であった。

実施例 15 3-*O*-[ $\beta$ -D-glucopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucuronopyranosyl]-22-*O*-[2,3,4-tri-*O*-acetyl- $\beta$ -D-xylopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-arabinopyranosyl]soyasapogenol AのNGF産生増強活性

(1) 実施例 10-(3) で得られた大豆胚芽 70%エタノール抽出物由来シリカカラム画分 3 をエタノール 5 mL に溶解し、ついで逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について述べる。カラムは TSK gel ODS-80Ts (21.5 mm $\times$ 30 cm) を用いた。溶媒 A (蒸留水とアセトニトリルを容量比 3 対 1 で混合したもの) と溶媒 B (蒸留水とアセトニトリルを容量比 1 対 3 で混合したもの) の溶出比は 0~15 分までは溶媒 B 比を直線的に 40~45% に、つづく 15~20 分までは溶媒 B 比を直線的に 45~10

0%に、つづく5分間は溶媒B比を100%に保持した。溶出速度は5 mL/分、検出は215 nmで行なった。溶出液の紫外線吸収を指標に、フラクションを分画した。

(2) 実施例15-(1)で大豆胚芽70%エタノール抽出物由来シリカカラム画分3を分画して得た大豆胚芽70%エタノール抽出物由来フラクションA(保持時間19.5分の検出のピークを含む)の質量スペクトル、NMRスペクトル、糖部分及び非糖部分の薄層クロマトグラフィーを実施例11-(1)と同様の方法で測定した。その結果、大豆胚芽70%エタノール抽出物由来フラクションAが3-O-[β-D-glucopyranosyl(1→2)-β-D-galactopyranosyl-(1→2)-β-D-glucuronopyranosyl]-22-O-[2,3,4-tri-O-acetyl-β-D-xylopyranosyl(1→3)-α-L-arabinopyranosyl]soyasapogenol A(分子量1364)であることを確定した。なお、当該化合物は上記表1における化合物mである。

(3) 化合物mのNGF産生増強活性を実施例2-(2)と同様の方法で測定した。その結果、化合物mにNGF産生増強活性があることが明らかになった。表2にその結果を示す。なお、コントロールのNGF産生量は0.898 ng/mLであった。

表 2

本発明の化合物	NGF 産生量 (%)			
	試料濃度 (mM)			
	0	0.5	1.0	2
化合物 a	100	228.3	231.6	212.6
化合物 b	100	220.9	251.2	272.3
化合物 c	100	255.1	289.2	323.7
化合物 d	100	255.8	281.1	276.5
化合物 e	100	214.0	233.7	230.1
化合物 f	100	204.5	208.8	218.5
化合物 g	100	295.4	277.2	247.6
化合物 h	100	273.3	301.7	307.2
化合物 i	100	N. T.	116.8	169.4
化合物 j	100	138.2	176.4	212.5
化合物 k	100	N. T.	115.9	456.3
化合物 l	100	N. T.	145.9	531.2
化合物 m	100	263.3	250.9	233.4

試料無添加（コントロール）の NGF 産生量を 100% として、試料添加区の NGF 産生量を % で示す

N. T. は試験していないことを示す

#### 実施例 16 13(18)-oleanene-3, 22, 24-triol の NGF 産生増強活性

(1) 実施例 10 - (2) で得た大豆胚芽 70% エタノール抽出物由来水不溶性画分の 0.04 容について、50% メタノール、2N 塩酸、80℃ の条件下で 3 時間加熱を行った。次に反応液と等量のジエチルエーテルで計 3 回抽出し、得られたエーテル層を減圧濃縮して白色粉末を得た。得られた白色粉末をヘキサン

で洗浄し、大豆胚芽・酸加水分解物を得た。

(2) 実施例 16-(1) で得られた大豆胚芽・酸加水分解物をクロロホルムに溶解し、シリカクロマトを用いて分画した。以下にその条件について示す。シリカゲルにはBW-300SP (樹脂量100mL) を用いた。展開溶媒としてクロロホルム：メタノール=100：1を用いて溶出を行ない、大豆胚芽・酸加水分解物由来シリカカラム画分1 (550mL)、画分2 (300mL)、画分3 (250mL) の順に溶出画分を得た。

(3) 実施例 16-(2) で得られた大豆胚芽・酸加水分解物由来シリカカラム画分2を4mLのエタノールに溶解し、逆相クロマトグラフィーを用いて分画した。以下にその条件について述べる。カラムはTSK gel ODS-80Ts (21.5mm×30cm) を用いた。溶媒には水とアセトニトリルを容量比1：9で混合したものを用い、溶出速度は5mL/分、検出は215nmで行なった。溶出液の紫外線吸収を指標に、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクションを分画した。

(4) 実施例 16-(3) で分画した大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクションa (溶出時間37.5分のピークを含むフラクション) の質量スペクトルを実施例2-(1) と同様の方法で測定した。マトリックスにはトリエタノールアミンを用いた。質量分析により $m/z$  457 (M-H)<sup>-</sup> のピークを検出した。第22図に、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクションaの質量スペクトルを示す。第22図において、横軸は $m/z$  値、縦軸は相対強度を示す。

大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクションaのNMRスペクトルを実施例2-(1) と同様の方法で測定した。NMRの帰属の信号を以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR :  $\delta$  0.70, 0.92 (3H, s, 29および30-CH<sub>3</sub>), 0.77 (1H, m, 5-H), 0.79 (3H, s, 26-CH<sub>3</sub>), 0.81 (3H, s, 25-CH<sub>3</sub>), 0.88 (3H, s, 28-CH<sub>3</sub>), 0.96 (1H, m, 1-H), 1.07 (1H, m, 15-H), 1.08 (3H, s, 23-CH<sub>3</sub>), 1.12 (3H, s, 27-CH<sub>3</sub>), 1.16 (1H, dd, J=4.8, 13.8 Hz, 11-H), 1.25

(1H, m, 16-H), 1.27 (1H, m, 21-H), 1.32 (1H, m, 6-H), 1.34 (1H, m, 21-H), 1.34 (1H, m, 7-H), 1.37 (1H, m, 7-H), 1.43 (1H, m, 9-H), 1.45 (1H, m, 11-H), 1.55 (1H, m, 6-H), 1.56 (1H, m, 2-H), 1.61 (1H, m, 15-H), 1.62 (1H, m, 19-H), 1.64 (1H, m, 2-H), 1.65 (1H, m, 1-H), 1.68 (1H, m, 16-H), 1.80 (1H, m, 12-H), 2.24 (1H, d, J=13.8 Hz, 19-H), 2.61 (1H, br-d, J=12.6 Hz, 12-H), 3.12 (1H, m, 22-H), 3.19 (1H, m, 3-H), 3.26 (1H, dd, J=7.8, 10.8 Hz, 24-H), 3.80 (1H, dd, J=2.4, 10.8 Hz, 24-H), 4.06 (1H, dd, J=2.4, 7.8 Hz, 24-OH), 4.26 (1H, d, J=4.8 Hz, 22-OH), 4.95 (1H, d, J=4.2 Hz, 3-OH)

但し、 $^1\text{H}$ -NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの残留プロトンの化学シフト値を2.51 ppmとして表した。第23図に、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクションaの $^1\text{H}$ -NMRスペクトルを示す。第23図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  17.3 (25-C), 17.4 (28-C), 18.1 (26-C), 19.6 (6-C), 22.1 (27-C), 22.4 (11-C), 23.8 (23-C), 25.8, 33.1 (29および30-C), 26.1 (12-C), 26.6 (15-C), 28.2 (2-C), 32.7 (20-C), 34.0 (16-C), 35.8 (7-C), 37.5 (10-C), 38.6 (19-C), 39.3 (1-C), 40.9 (17-C), 41.5 (8-C), 43.1 (4-C), 44.7 (14-C), 44.8 (21-C), 51.0 (9-C), 56.3 (5-C), 63.8 (24-C), 76.6 (22-C), 79.5 (3-C), 133.0 (18-C), 136.9 (13-C)

但し、 $^{13}\text{C}$ -NMRにおいてはサンプルは重ジメチルスルホキシドに溶解し、重ジメチルスルホキシドの化学シフト値を40.2 ppmとして表した。第24図に、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクションaの $^{13}\text{C}$ -NMRスペクトルを示す。第24図において、横軸は化学シフト値、縦軸はシグナルの強度を示す。

以上、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクションaについて行ったMSスペクトル、NMRスペクトル解析の結果、大豆胚芽・酸加水分解物由来フラクションaが13(18)-oleanene-3, 22, 24-triol (分子量458) であることが確定した。なお

、当該化合物は上記表 1 における化合物 n である。

(5) 化合物 n の NGF 産生増強活性を実施例 2 - (2) と同様の方法で測定した。培地への添加量は最終濃度で表 3 に示す通りとした。その結果、化合物 n に NGF 産生増強活性があることが明らかになった。表 3 にその結果を示す。なお、コントロールの NGF 産生量は 0.372 ng/mL であった。

表 3

本発明の化合物	NGF 産生量 (%)		
	試料濃度 (mM)		
	0	25	50
化合物 n	100	197.9	522.6
試料無添加 (コントロール) の NGF 産生量を 100% として、試料添加区の NGF 産生量を % で示す			

#### 実施例 17 グリチルリチンの NGF 産生増強活性

グリチルリチン (和光純薬工業社製) の NGF 産生増強活性を実施例 2 - (2) と同様の方法で測定した。培地への添加量は最終濃度で表 4 に示す通りとした。その結果、グリチルリチンに NGF 産生増強活性があることが明らかとなった。表 4 にその結果を示す。なお、コントロールの NGF 産生量は 0.484 ng/mL であった。

表 4

本発明の化合物	NGF 産生量 (%)			
	試料濃度 (mM)			
	0	0.25	0.5	1.0
グリチルリチン	100	113.0	204.3	261.0

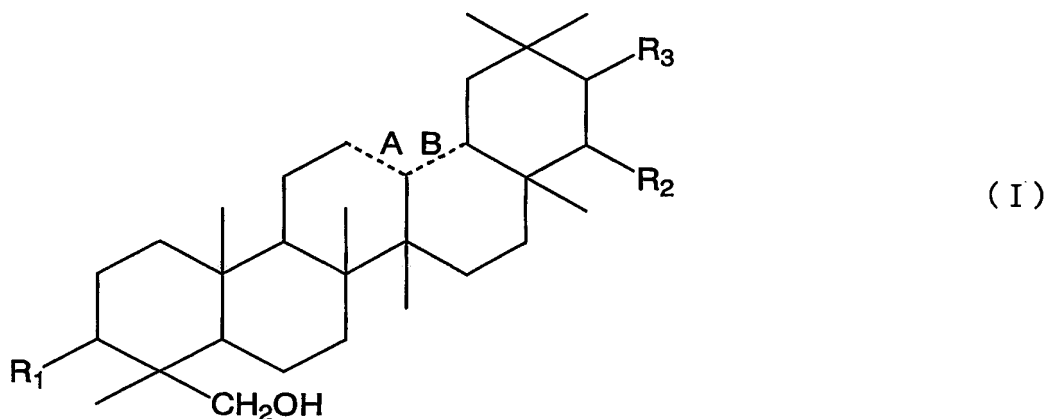
試料無添加（コントロール）のNGF産生量を100%として、試料添加区のNGF産生量を%で示す

#### 産業上の利用可能性

本発明により、食用植物由来の安全なサポニン類化合物、サポゲニン類化合物又はそれらの塩を高含有する医薬、飲食品、飼料が提供される。これらはそのNGF産生増強作用により脳神経系疾患の治療、予防、症状改善に有用である。特に飲食品は日常的にサポニン類化合物等の一定量を摂取することを可能にし、生体の恒常性維持用飲食品、NGF産生増強用飲食品として極めて有用である。

## 請求の範囲

1. 下記一般式 (I) で表される化合物又はその塩。



(式中、点線で示した結合子のうちAが二重結合を示し、Bが単結合を示す場合、 $R_1$  は  $-O-GlcUA-Gal-Glc$  を示し、 $R_2$  は  $-O-Ara-2-AcXyl$ 、 $-O-Ara-3-AcXyl$ 、 $-O-Ara-4-AcXyl$ 、 $-O-Ara-2,3-diAcXyl$ 、 $-O-Ara-2,4-diAcXyl$ 、 $-O-Ara-3,4-diAcXyl$ 、または  $-O-Ara-3,4,6-triAcGlc$  を示し、かつ  $R_3$  は  $-OH$  を示す。またAが単結合を示し、Bが二重結合を示す場合、 $R_1$  は  $-OH$  を示し、 $R_2$  は  $-OH$  を示し、かつ  $R_3$  は  $-H$  を示す。なお、 $GlcUA$  はグルクロン酸残基、 $Gal$  はガラクトース残基、 $Glc$  はグルコース残基、 $Ara$  はアラビノース残基、 $AcXyl$  はアセチル化されたキシロース残基、 $AcGlc$  はアセチル化されたグルコース残基を意味する。)

2. 請求項1記載の化合物及び／又は薬理学的に許容されるその塩を有効成分として含有することを特徴とする当該化合物に感受性を示す疾患の治療剤または



予防剤。

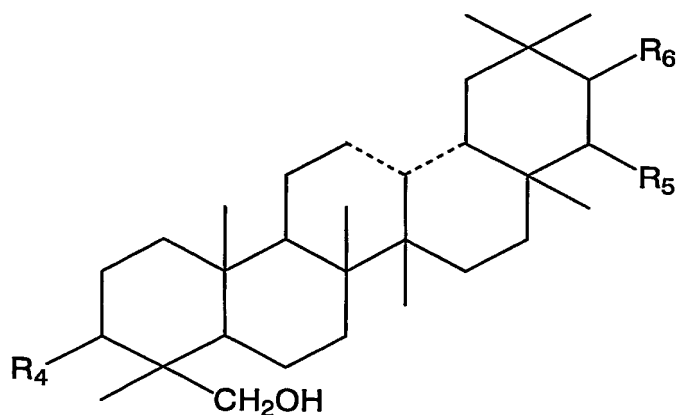
3. 請求項 1 記載の化合物及び／又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする神経成長因子産生増強剤。

4. 請求項 1 記載の化合物及び／又はその塩を有効成分として含有することを特徴とする食品、飲料又は飼料。

5. 神経成長因子産生増強用である請求項 4 記載の食品、飲料又は飼料。

6. ソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物、グリチルリチン及び薬理的に許容されるそれらの塩からなる群より選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする、治療又は予防に神経成長因子産生増強を要する疾患の治療剤または予防剤。

7. ソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物が下記一般式 (I I) で表わされるソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物である請求項 6 記載の治療剤または予防剤。



(I I)

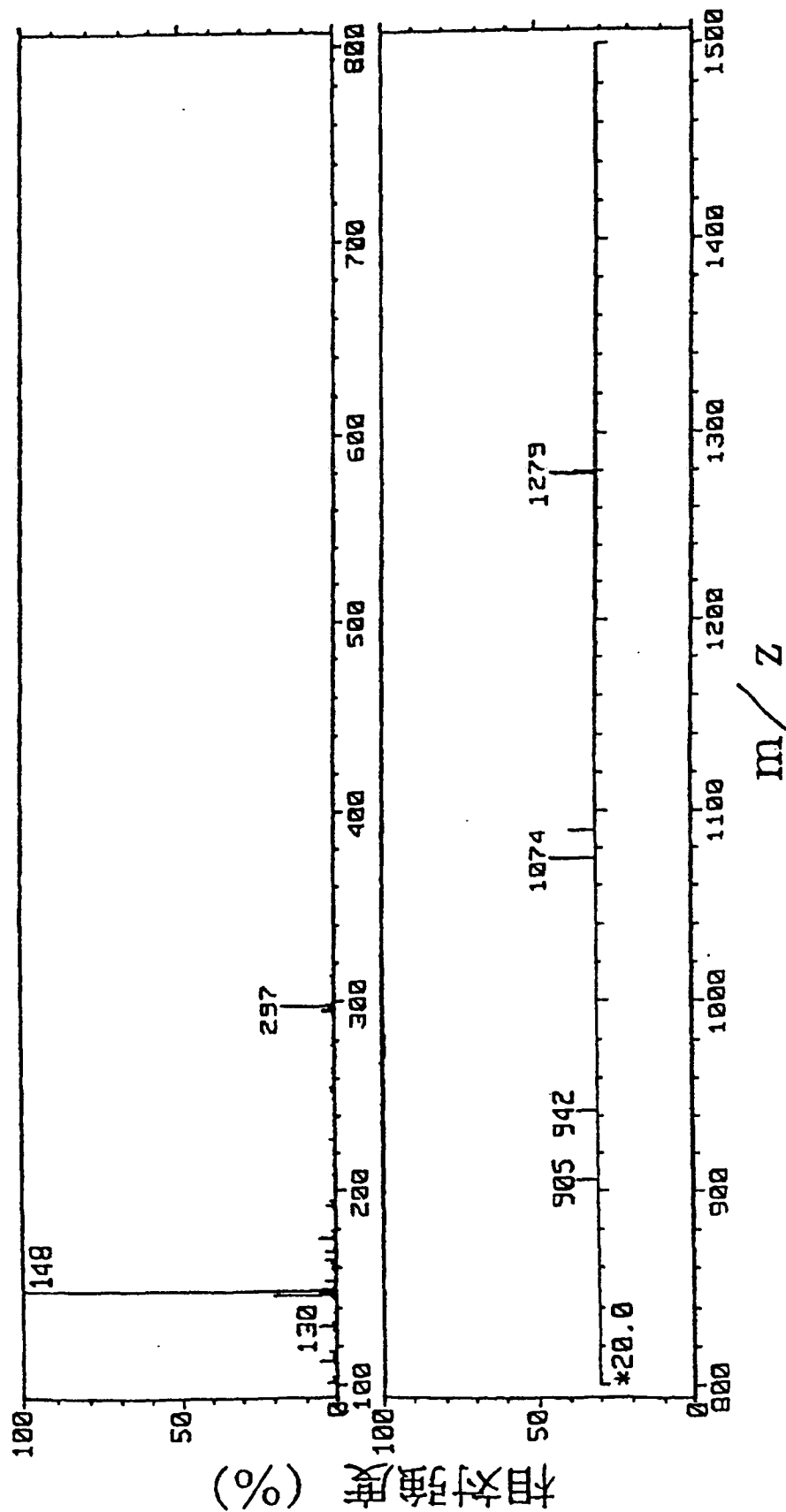
(式中、点線で示した結合子は単結合もしくは二重結合を示し、 $R_4$  は $-OH$ もしくは $-O-$ 糖残基を示し、 $R_5$  は $-OH$ 、 $=O$ もしくは $-O-$ 糖残基を示し、 $R_6$  は $-OH$ もしくは $-H$ を示す。)

8. ソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物、グリチルリチン及びそれらの塩からなる群より選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする神経成長因子産生増強剤。

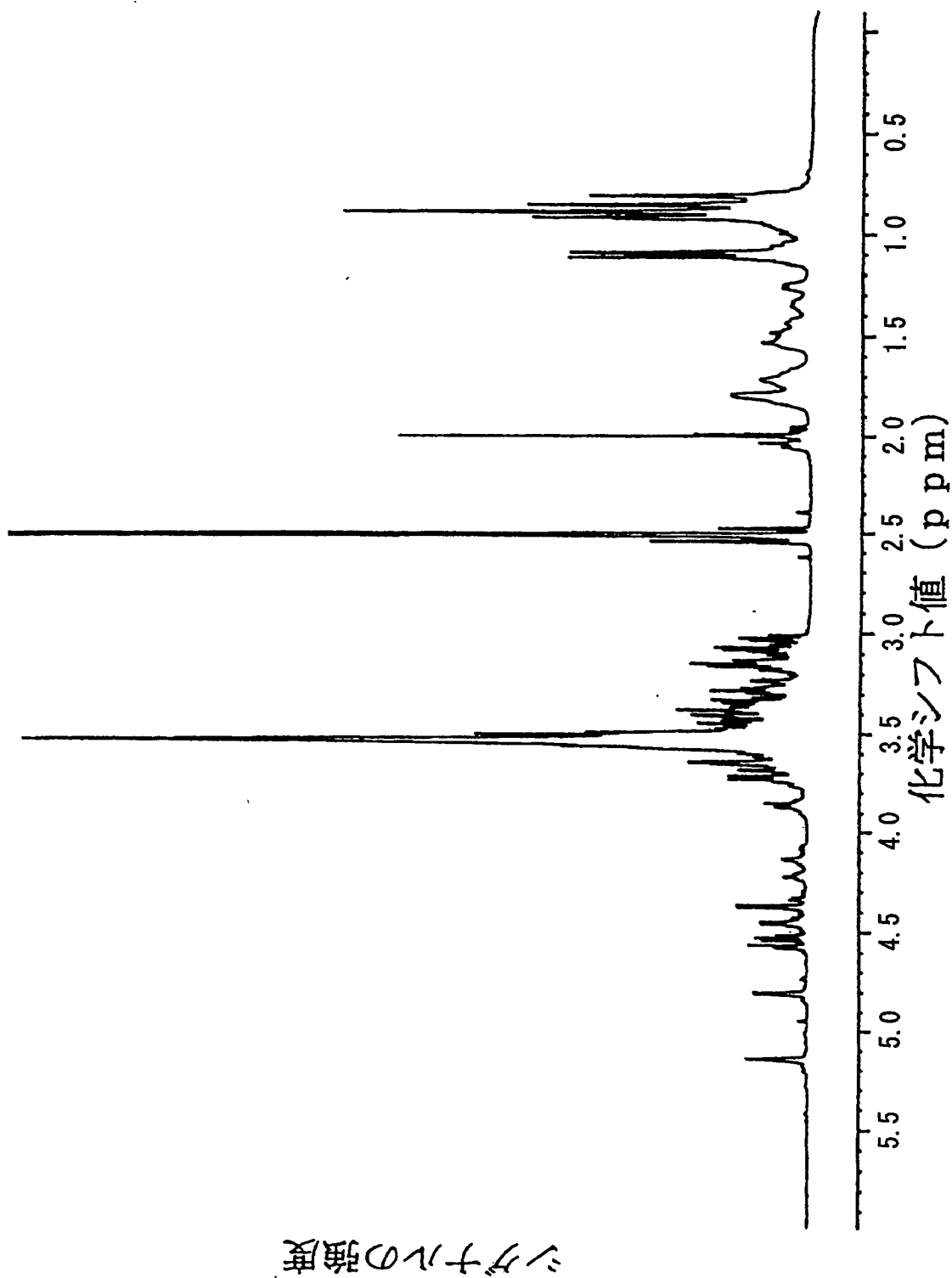
9. ソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物が請求項7に記載の一般式(I I)で表わされるソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物である請求項8記載の神経成長因子産生増強剤。

10. ソヤサポニン類化合物、ソヤサポゲニン類化合物、グリチルリチン及びそれらの塩からなる群より選択される化合物を有効成分として含有することを特徴とする神経成長因子産生増強用食品、飲料又は飼料。

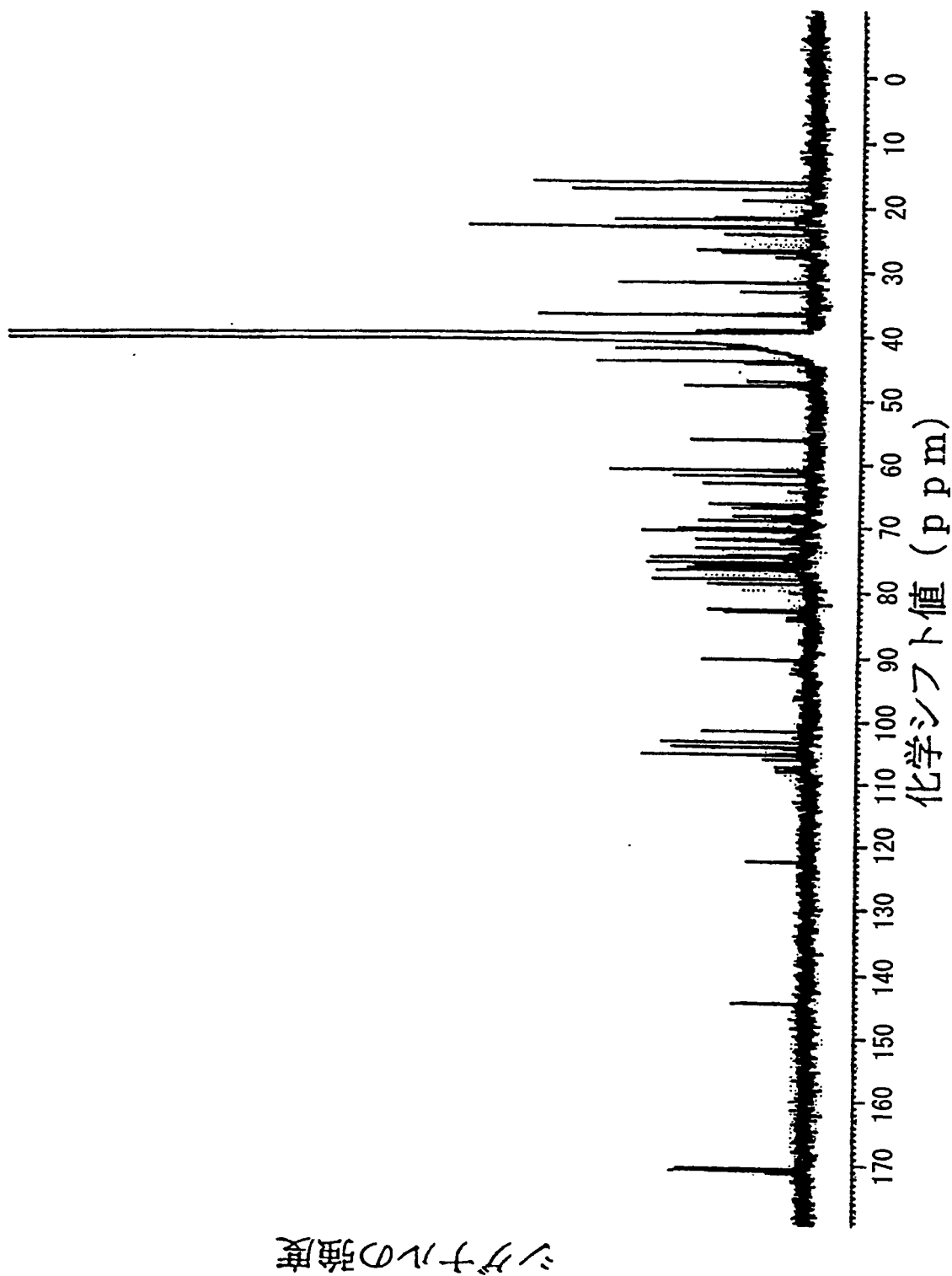
11. ソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物が請求項7に記載の一般式(I I)で表わされるソヤサポニン類化合物及びソヤサポゲニン類化合物である請求項10記載の神経成長因子産生増強用食品、飲料又は飼料。



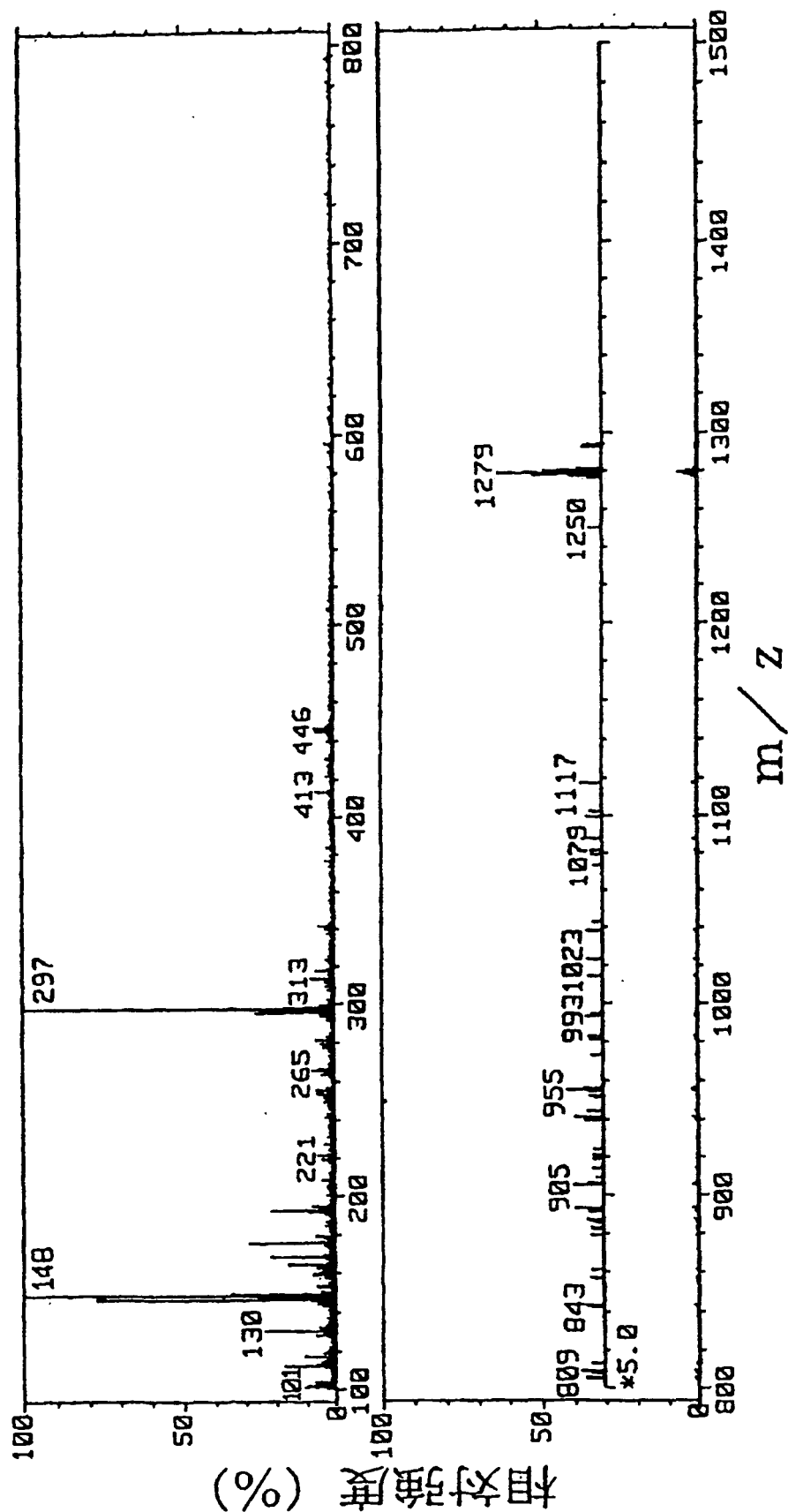
第1図



第2図



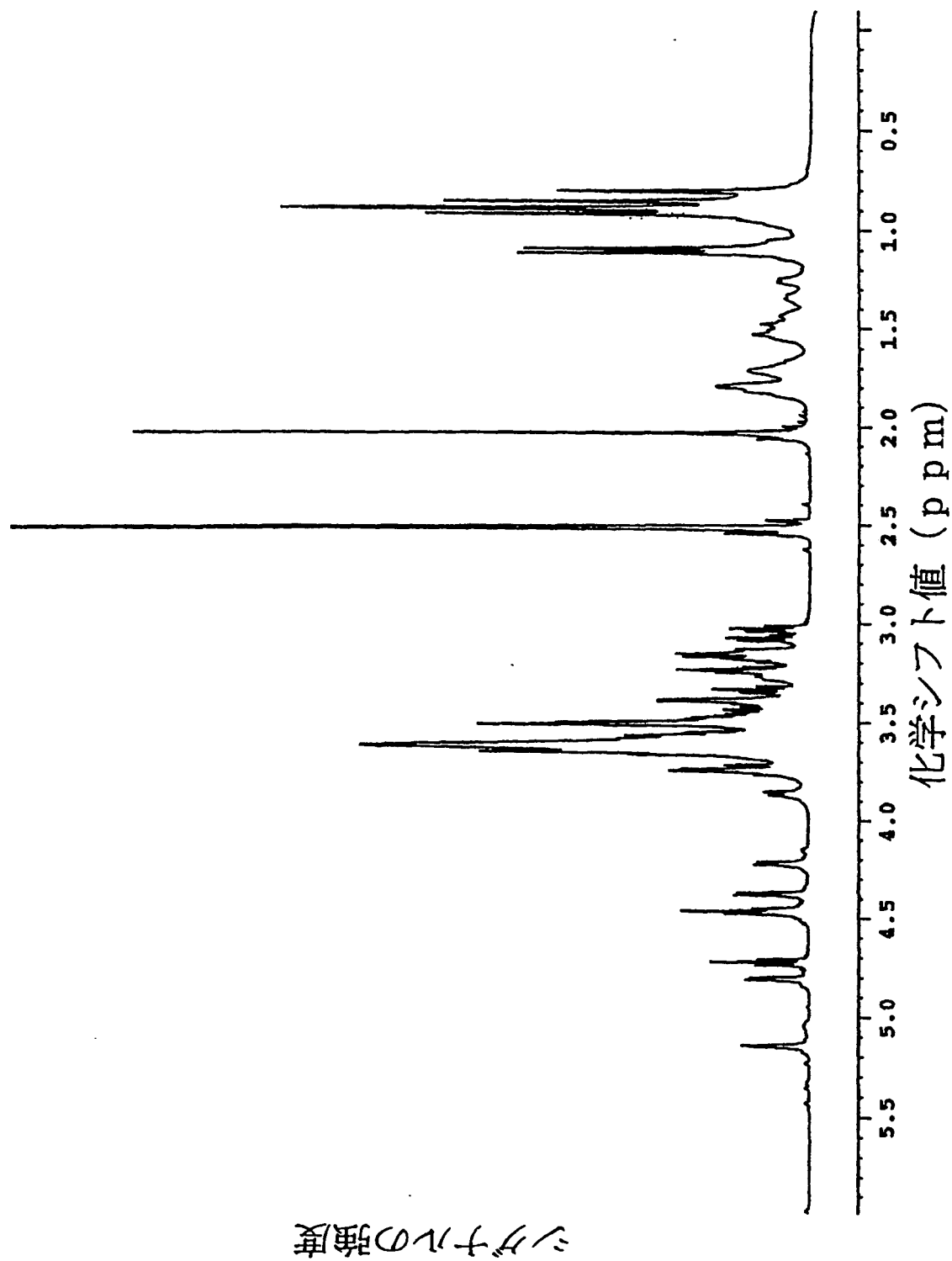
第3図



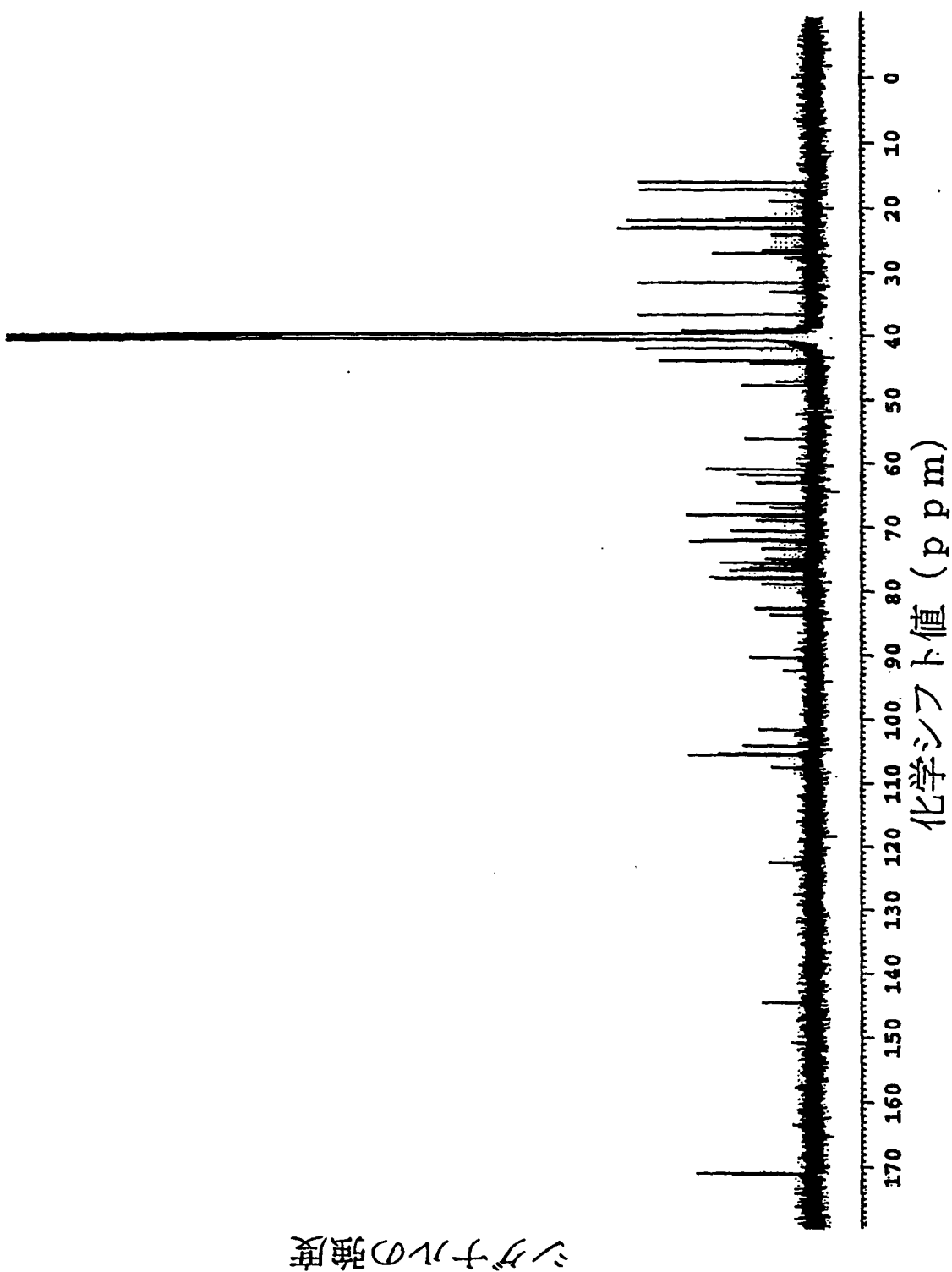
4/24

差替え用紙 (規則26)

第4図

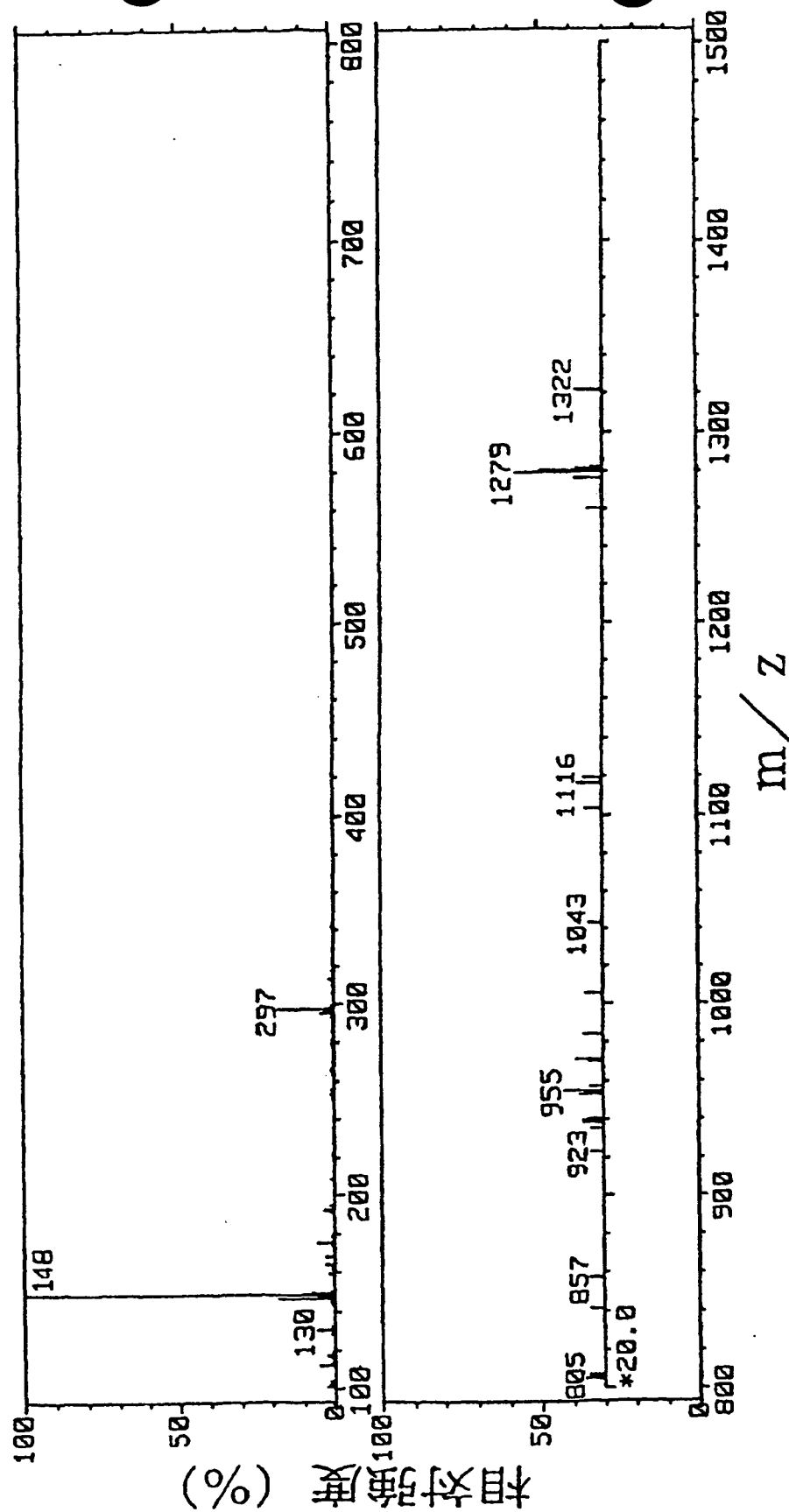


第5図



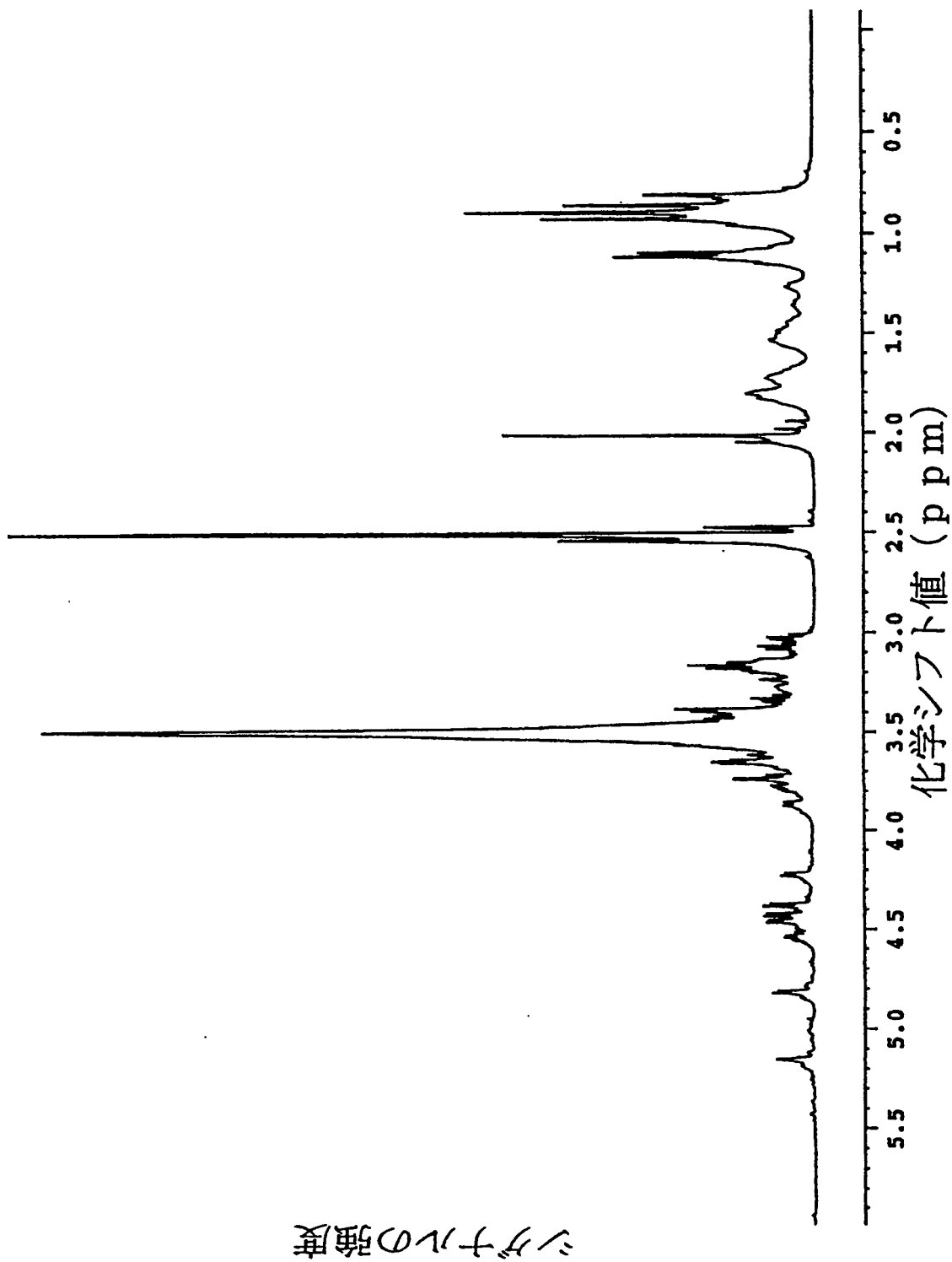
第6図



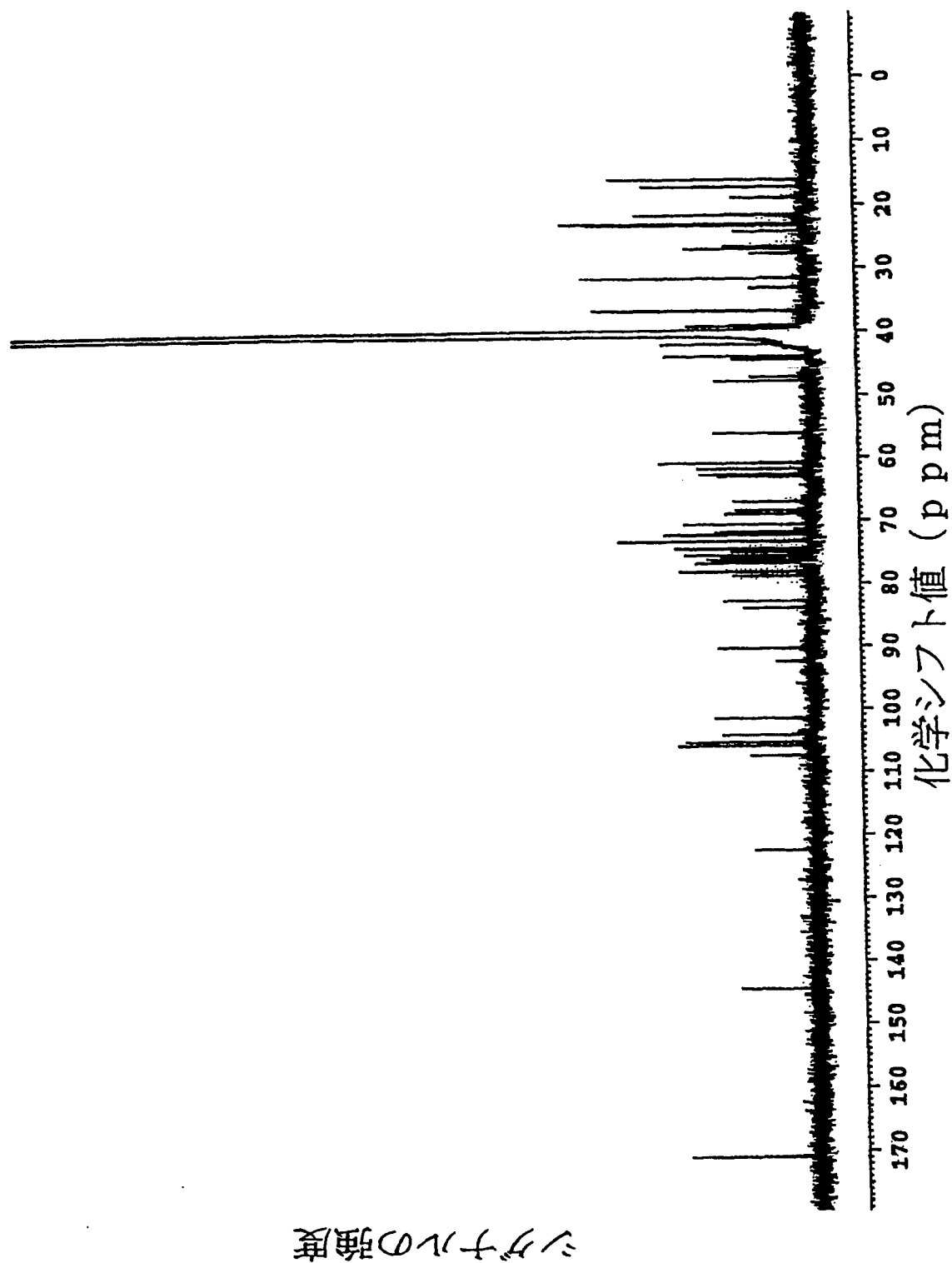


第7図

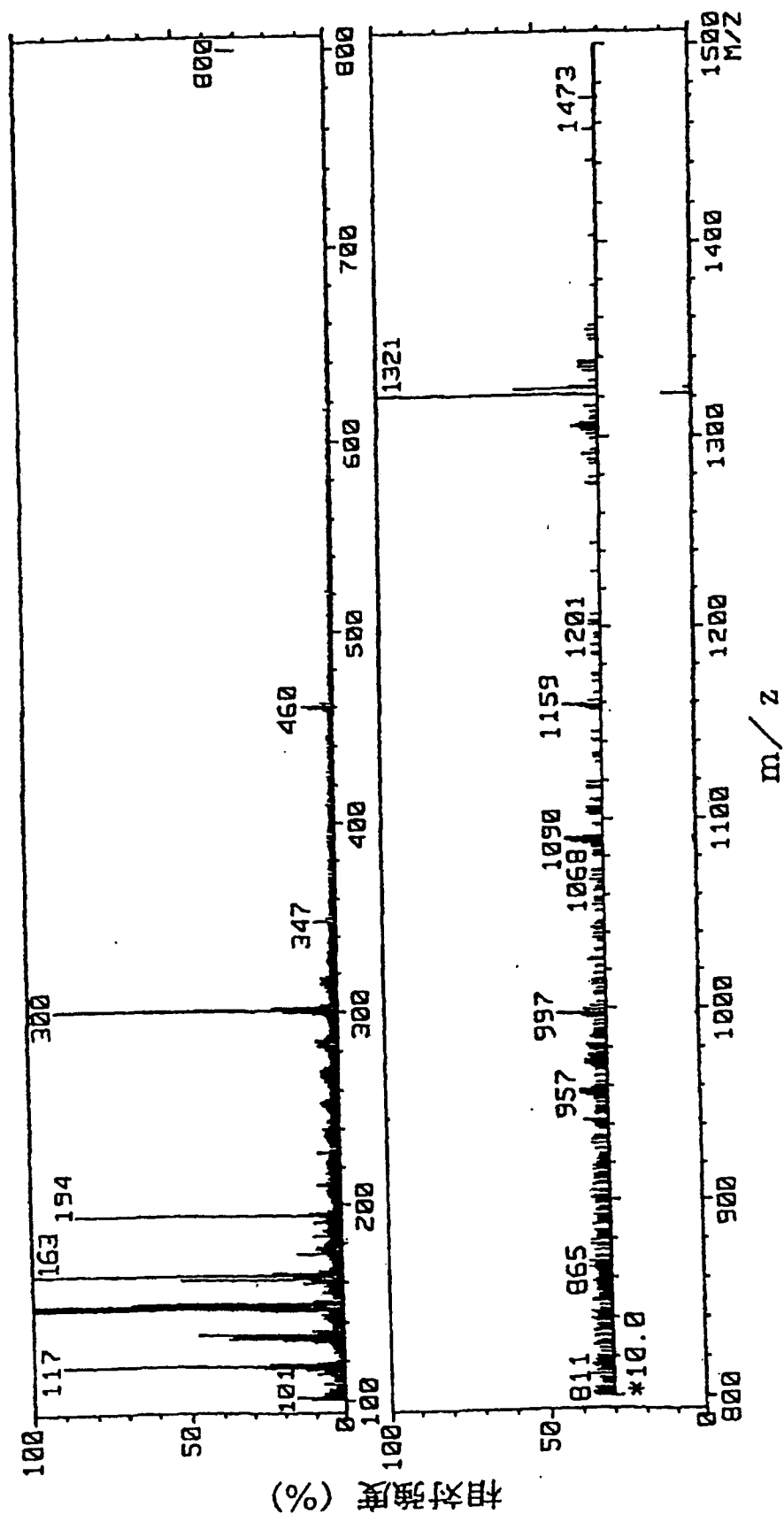
7/24



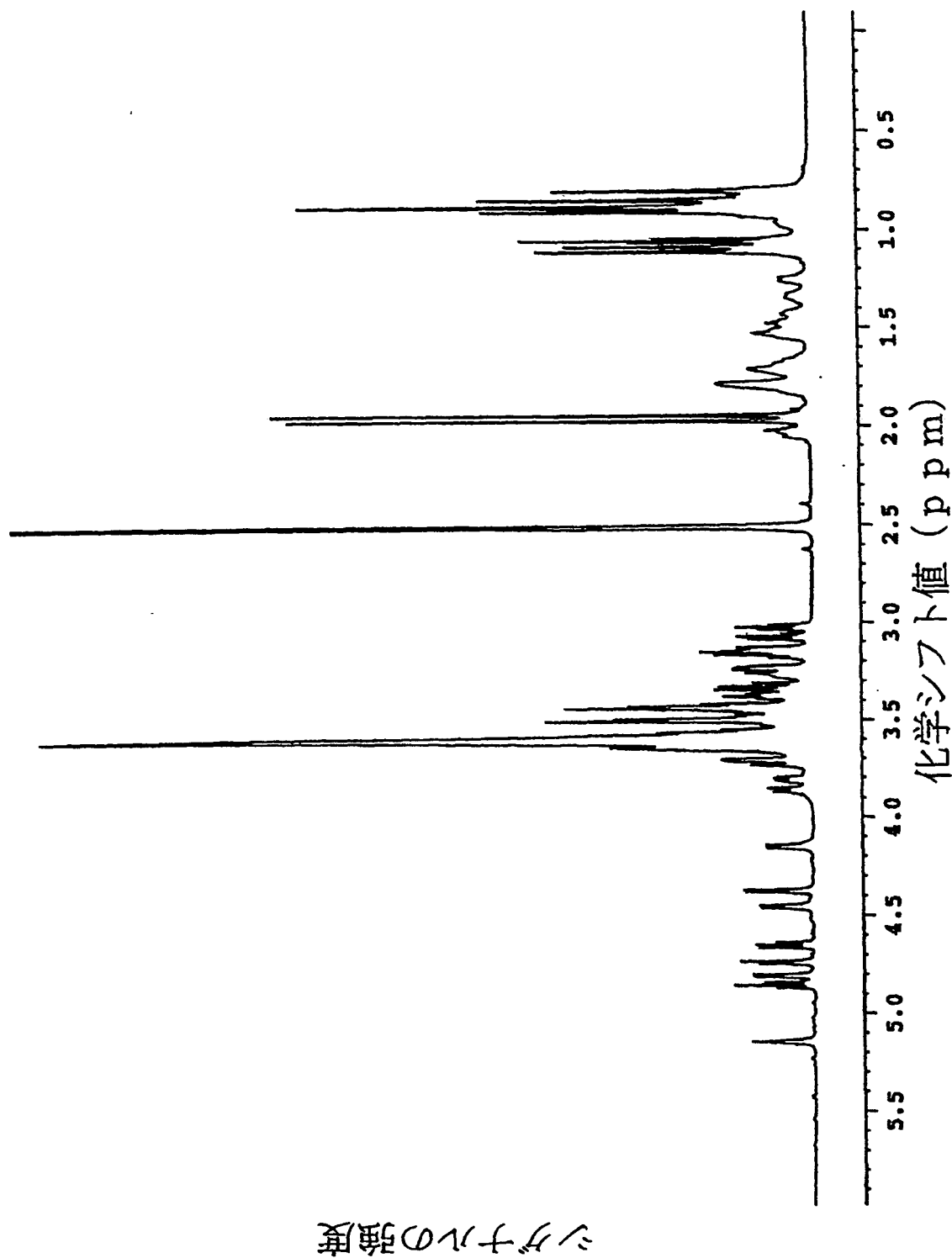
第8図



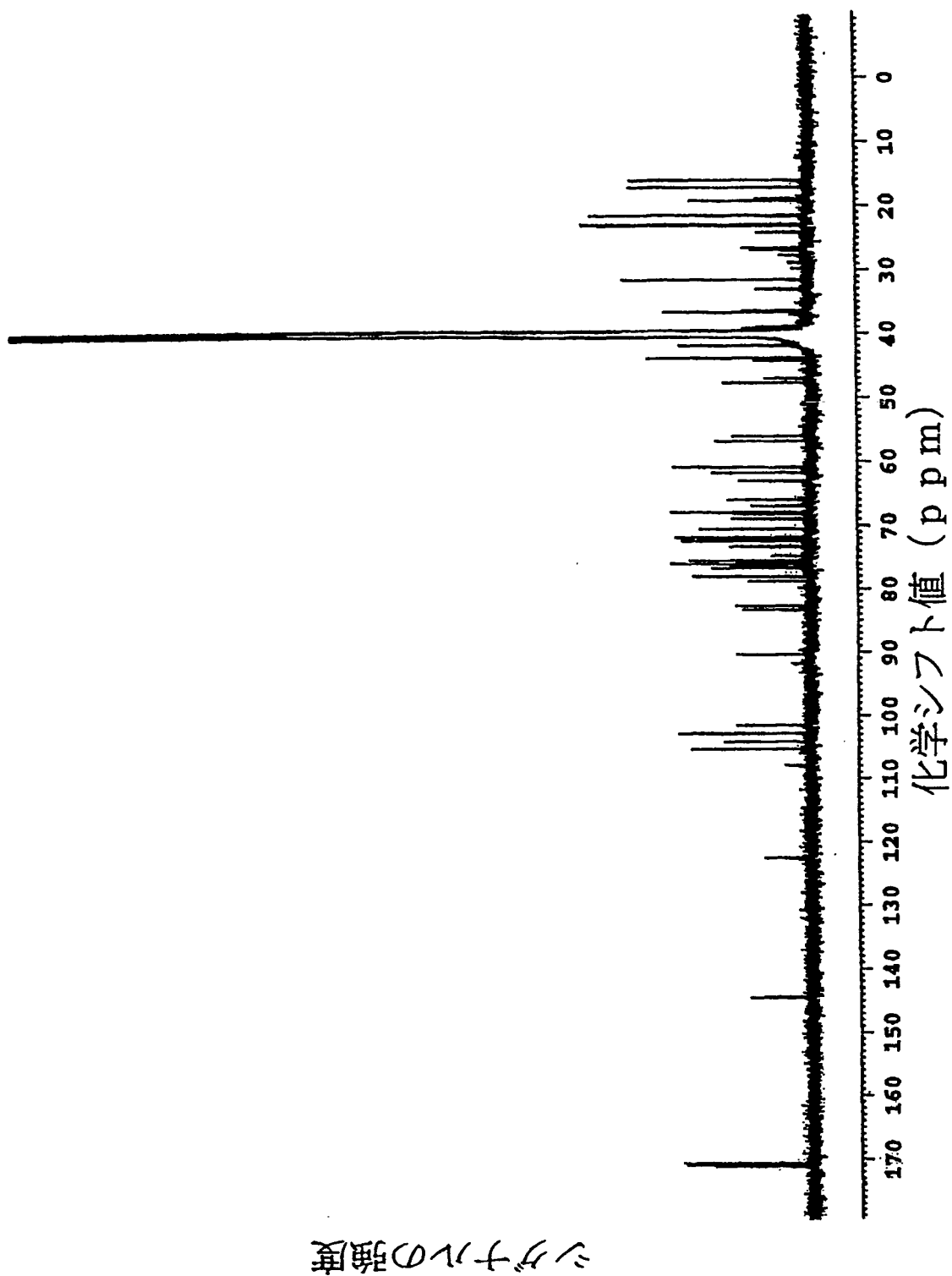
第9図



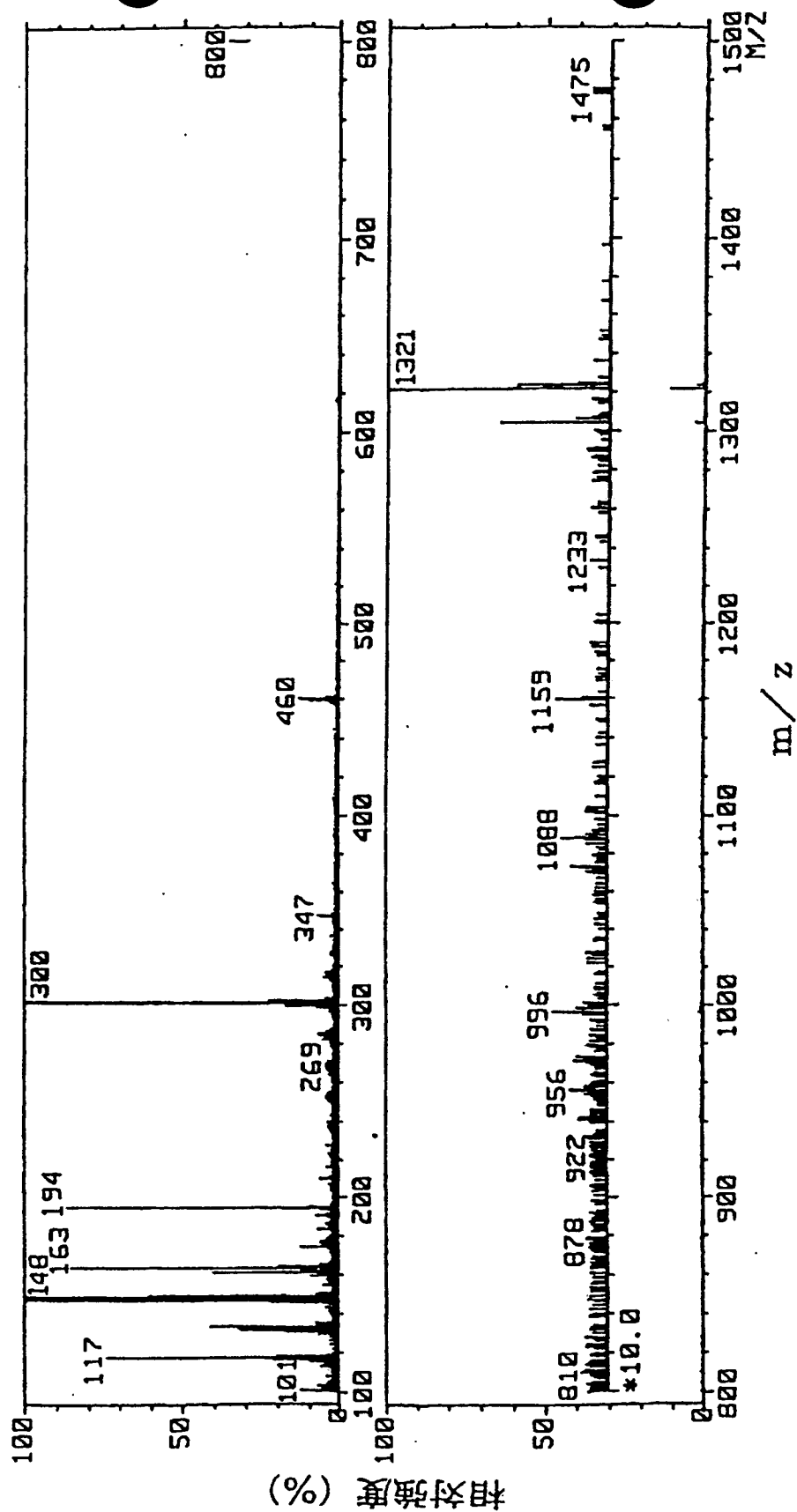
第10図



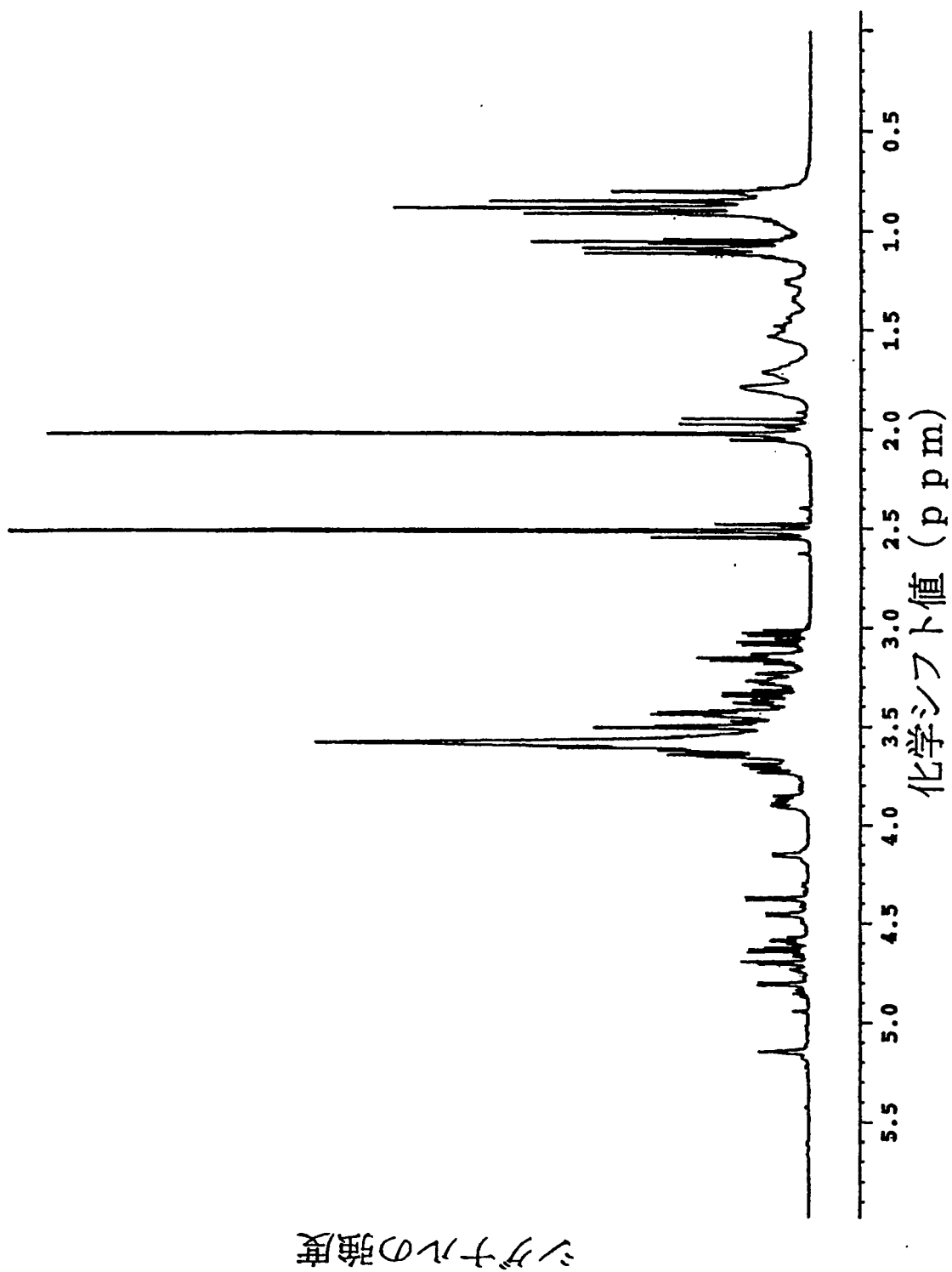
第11図



第12図

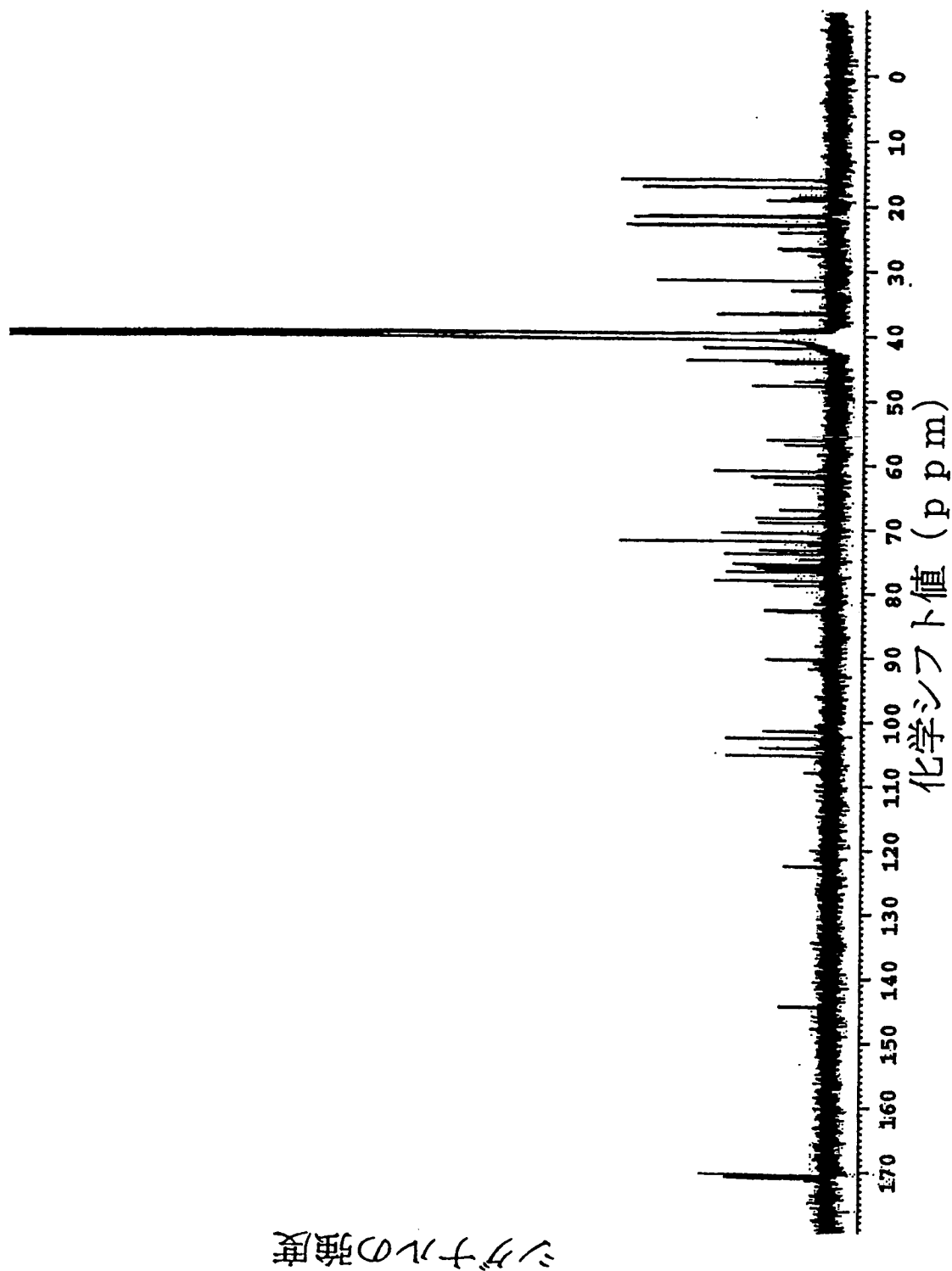


第 1 3 図

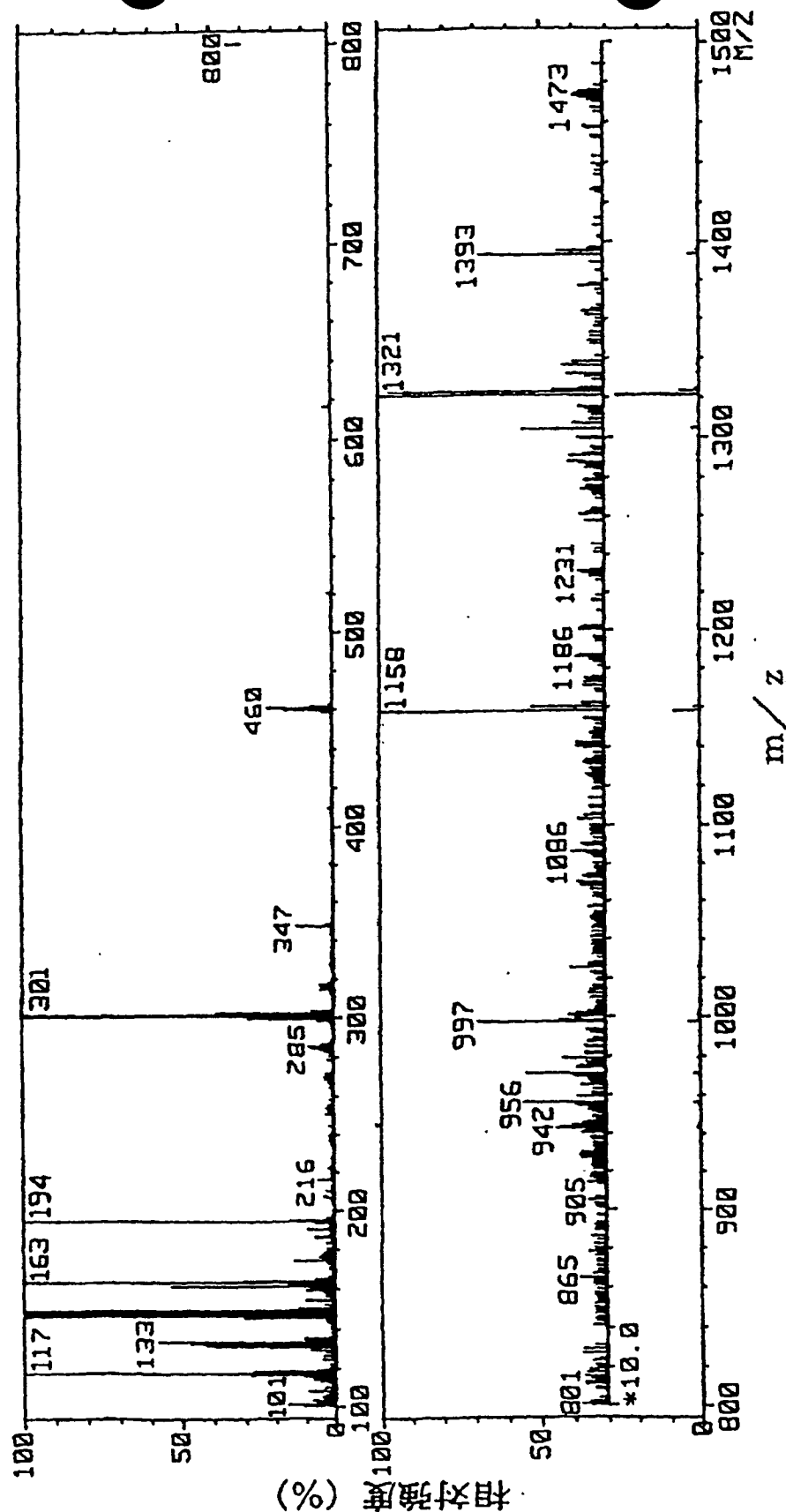


第14図

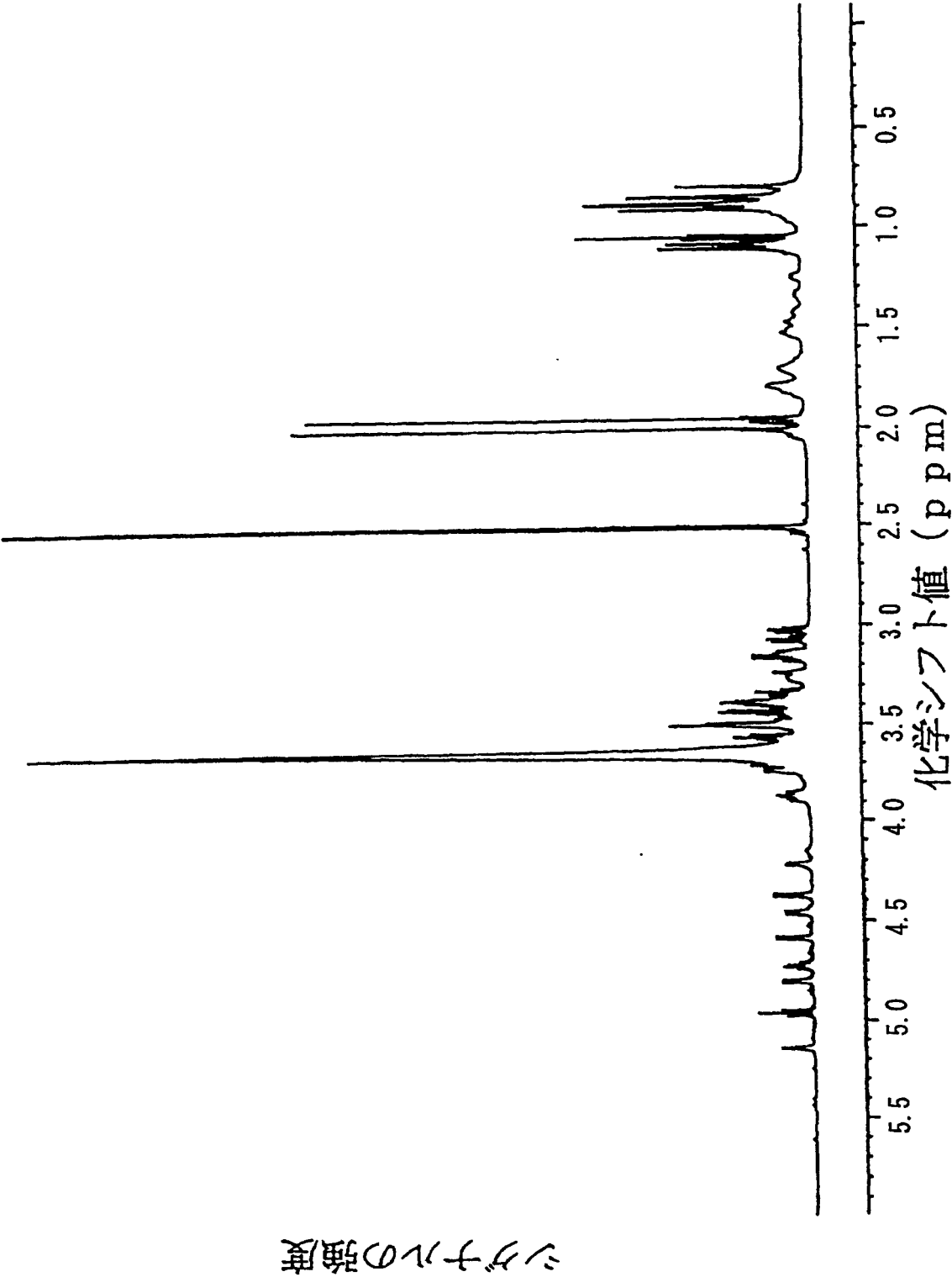




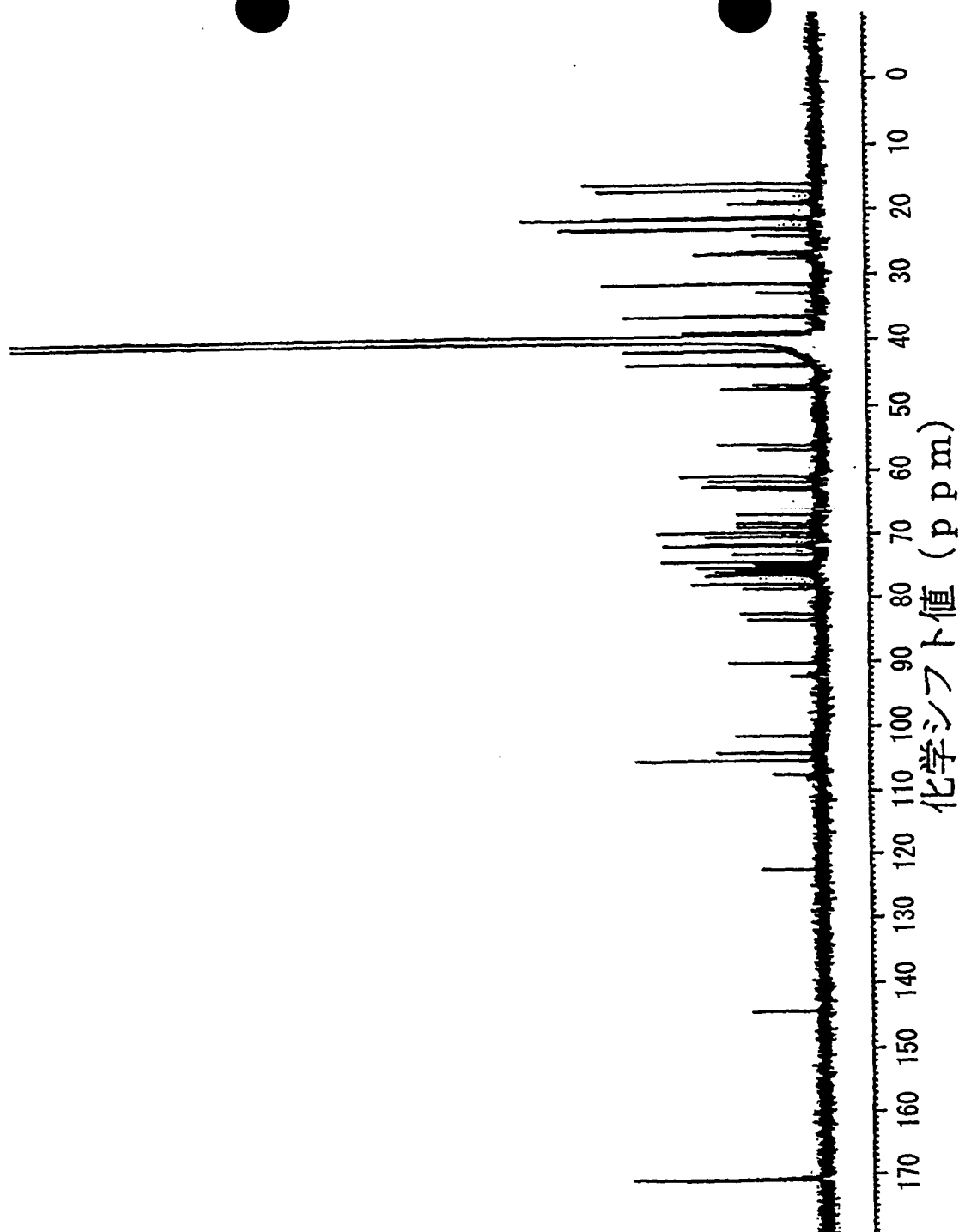
第15図



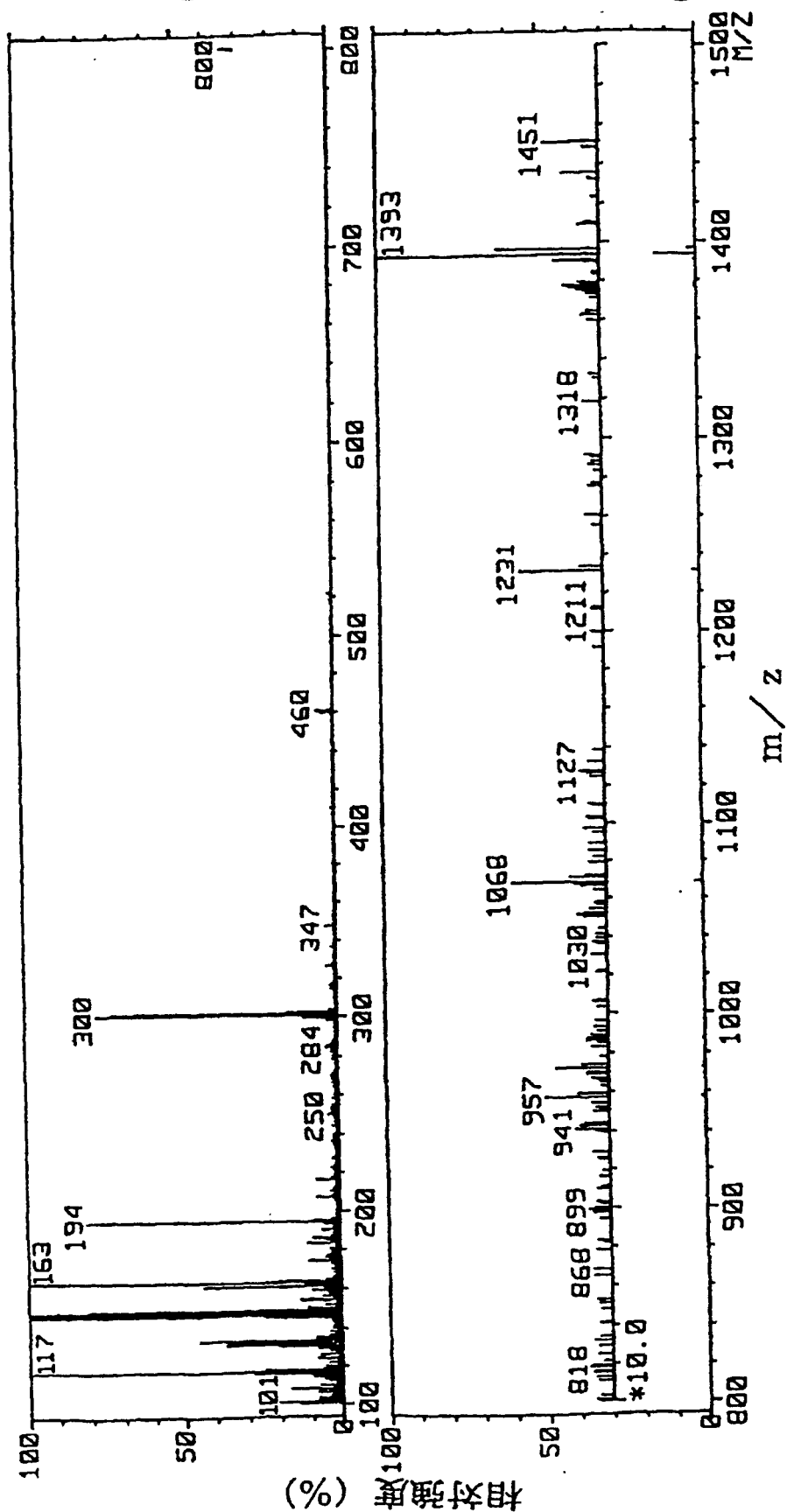
第 16 図



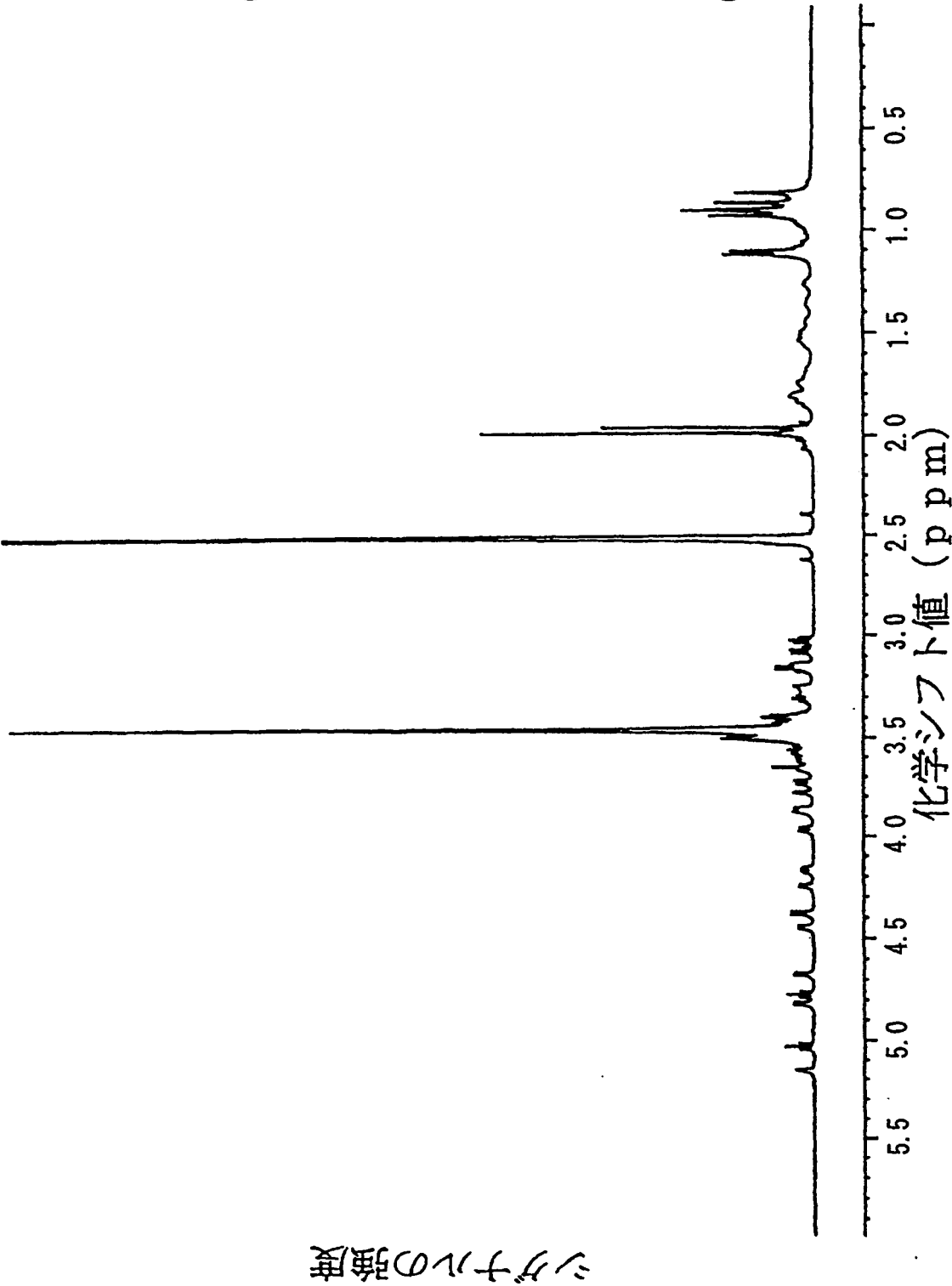
第17図



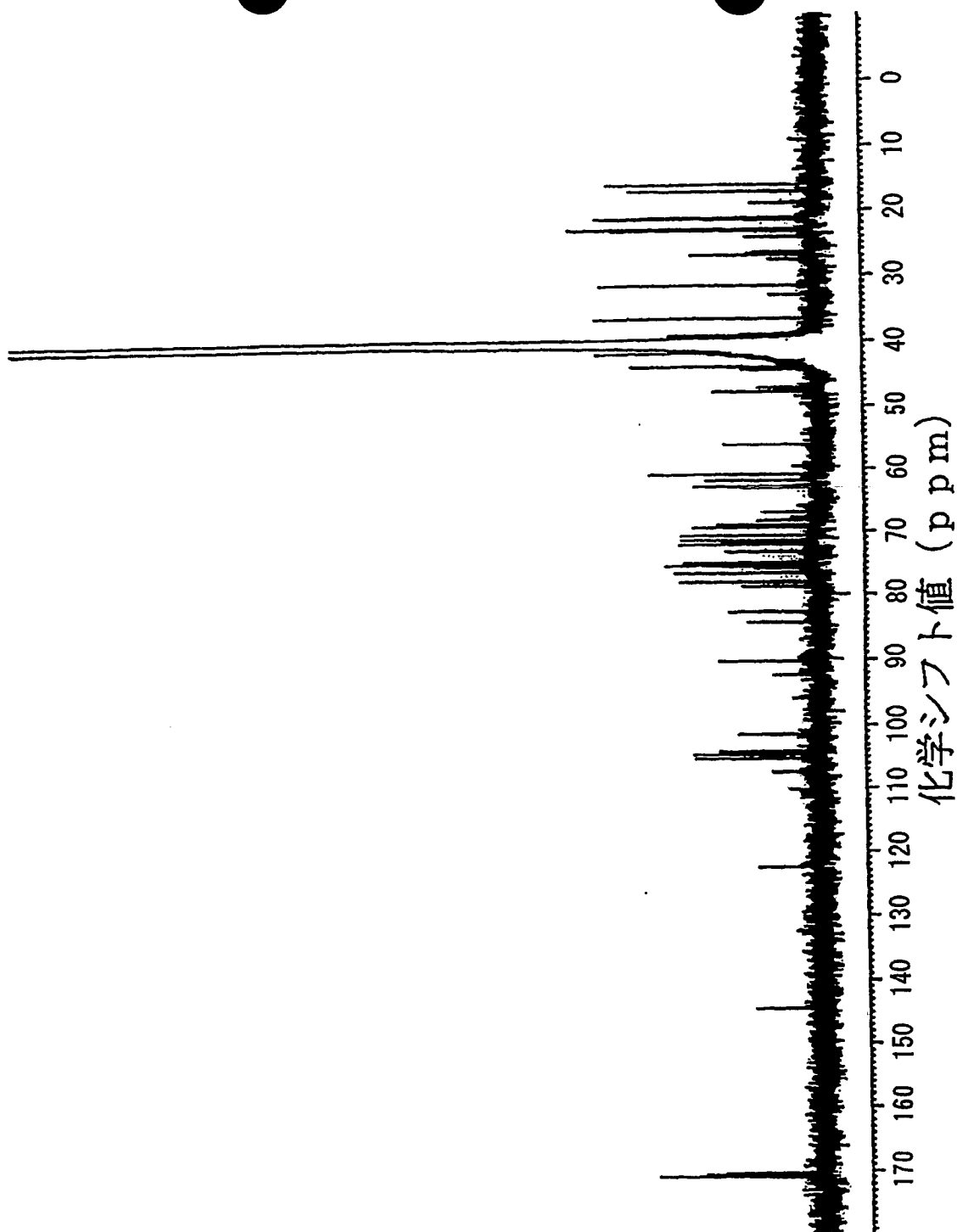
第18図



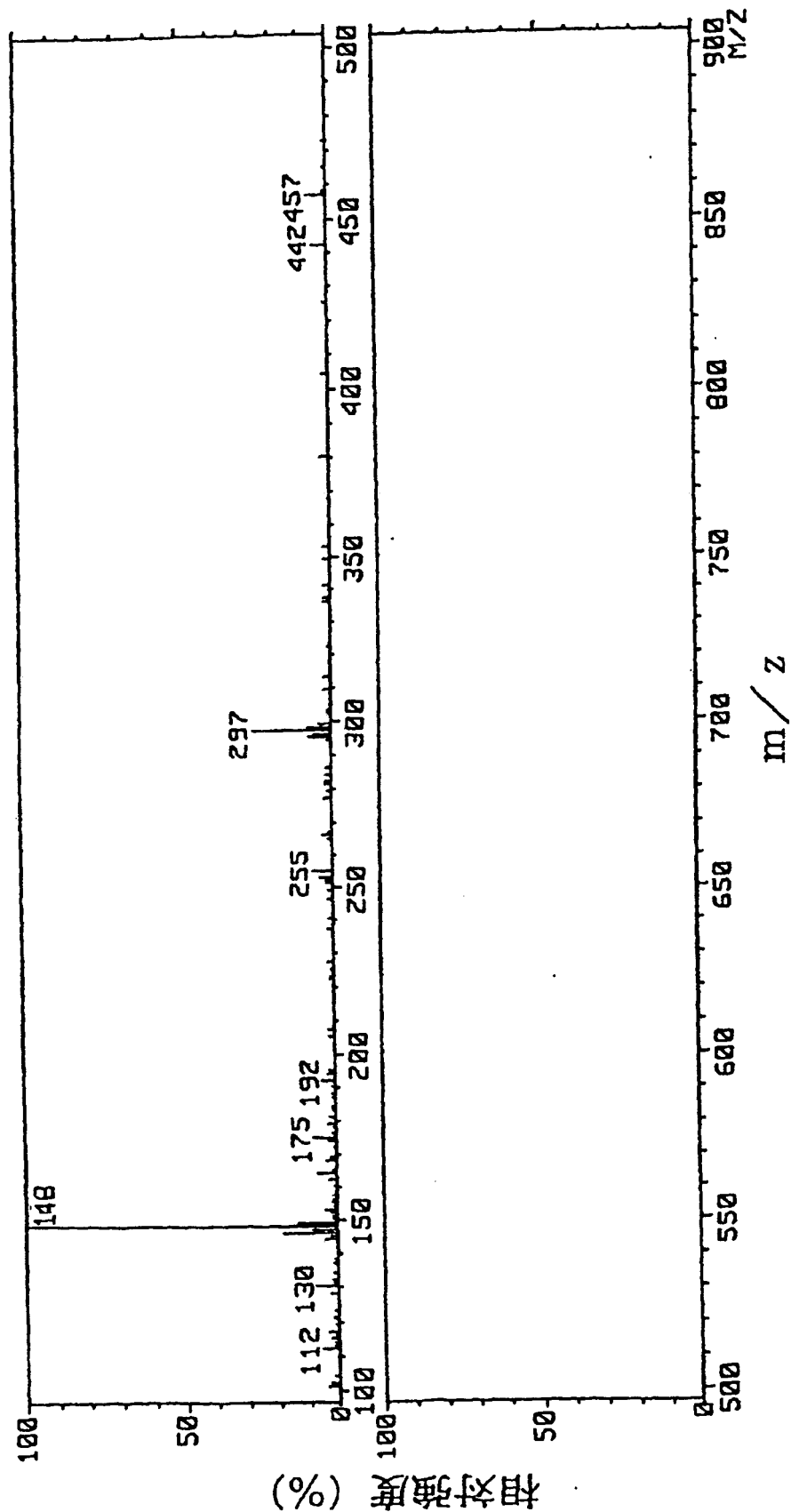
第19図



第20図

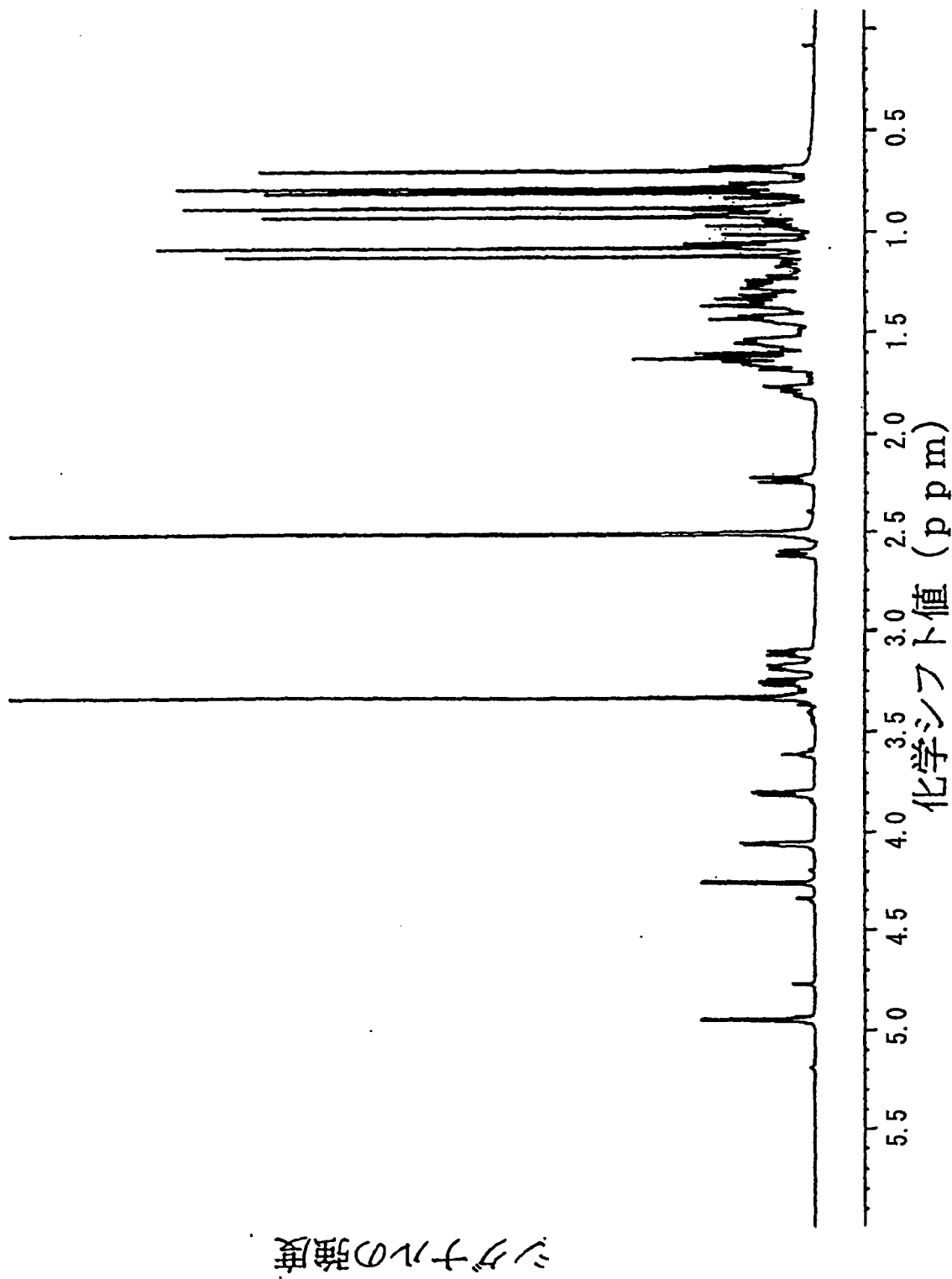


第21図

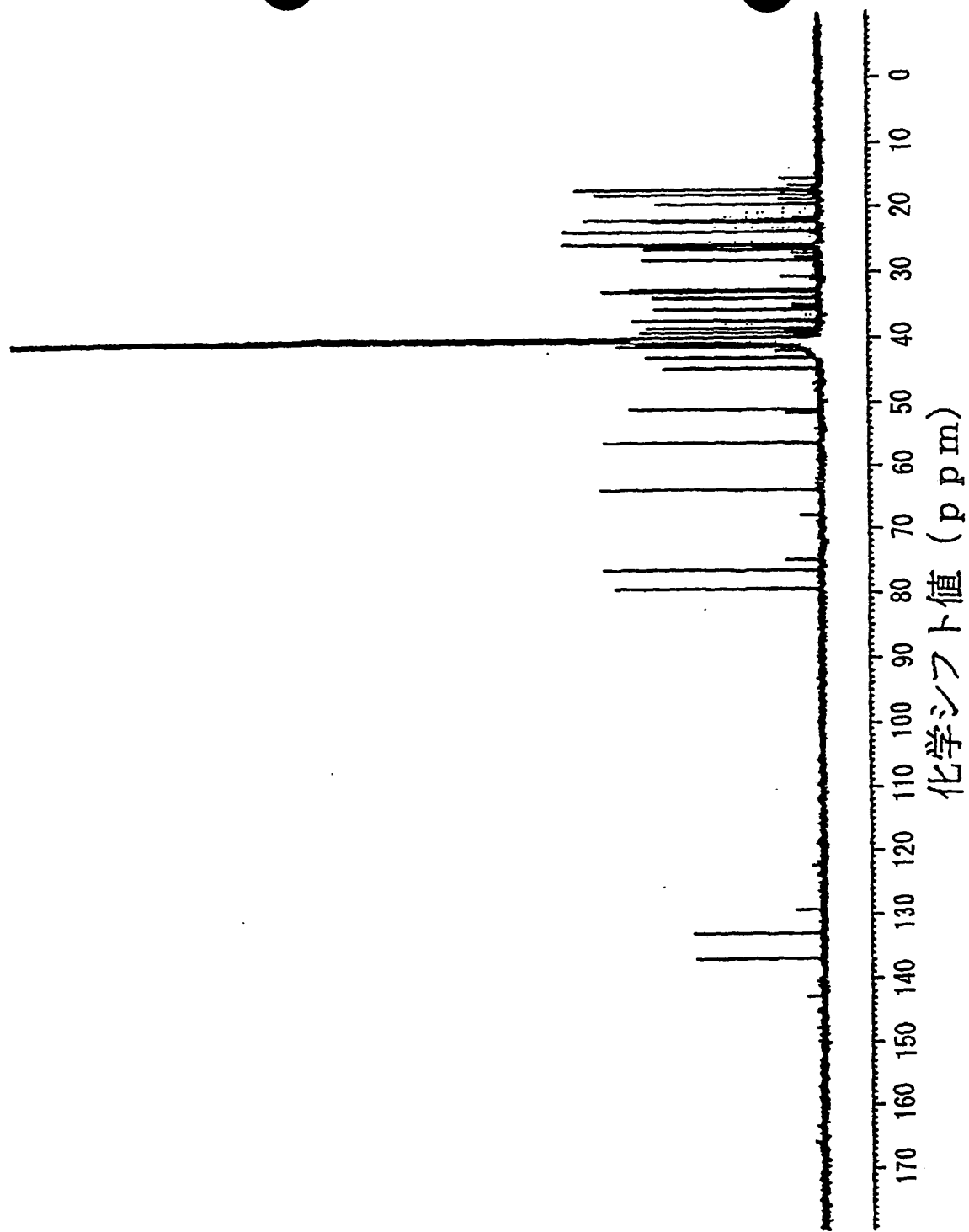


第 2 2 図





第23図



第24図

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09060

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07C35/44, A61K31/704, 31/56, A61P9/00, 25/00, A61P27/02, 35/00, 43/00, A23L1/30, C07H15/256, C07J63/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07C35/44, A61K31/704, 31/56, A61P9/00, 25/00, A61P27/02, 35/00, 43/00, A23L1/30, C07H15/256, C07J63/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHASHI B.M., 'Triterpenoid Saponins from Medicago	1, 2, 4
A	Hispida.', Phytochemistry, 1991, Vol.30, No.10, pages 3389 to 3393, compound 4, (p3390)	3, 5-11
A	JP 9-100295 A (Toray Industries, Inc.), 15 April, 1997 (15.04.97), Claims; examples (Family: none)	1-11
A	JP 11-43440 A (The Kitasato Institute), 16 February, 1999 (16.02.99), Claims; examples (Family: none)	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 08 October, 2003 (08.10.03)

Date of mailing of the international search report  
 28 October, 2003 (28.10.03)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07C35/44, A61K31/704, 31/56, A61P9/00, 25/00,  
A61P27/02, 35/00, 43/00, A23L1/30, C07H15/256,  
C07J63/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07C35/44, A61K31/704, 31/56, A61P9/00, 25/00,  
A61P27/02, 35/00, 43/00, A23L1/30, C07H15/256,  
C07J63/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)  
REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	SHASHI B.M., 'Triterpenoid Saponins from Medicago Hispida.', Phytochemistry, 1991, Vol. 30, No. 10, pp3389-3393, 化合物 4 (p3390)	1, 2, 4 3, 5-11
A	J P 9-100295-A (東レ株式会社) 1997. 04. 1. 5, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-11
A	J P 11-43440 A (社団法人北里研究所) 1999. 0 2. 16, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-11

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.10.03

国際調査報告の発送日 28.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

井上 千弥子



4 H

9356

電話番号 03-3581-1101 内線 3443